

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie

Výskyt RNA elementů u rodu

Armillaria

RNA elements in the genus

Armillaria

Praha 2008

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jiří Gabriel, DrSc
Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha 4-Krč

Práci jsem vypracoval samostatně, jen s použitím citované literatury a pod vedením příslušného vedoucího diplomové práce.

Poděkování:

Chtěl bych na tomto místě poděkovat RNDr. Jiřímu Gabrielovi, DrSc za vedení a poskytnutí množství nápadů při vypracování této práce. Dále pak RNDr. Martinovi Pospíškovi Ph.D. za možnost pracovat v jeho laboratoři a Mgr. Tomáši Maškovi Ph.D. Děkuji také Mgr. Ondřeji Tomanovi Ph.D. za to, že jsem měl tu čest být dva roky členem jeho týmu.

V neposlední řadě děkuji rodičům a všem přátelům za poskytnutou podporu.

Tato práce vznikla v letech 2006 – 2008.

Abstract

RNA elements in the genus *Armillaria*

Mycoviruses are widespread among the fungi. Most mycoviruses reported have dsRNA genomes. The first mycovirus was found in the edible mushroom *Agaricus bisporus*. Mycoviruses do not have an extracellular phase of their life cycle and are transmitted only by intracellular routes. Many mycoviruses reveal no apparent effect on their hosts. The genus *Armillaria* represents economically important edible fungal pathogens causing root rot in conifers and broadleaves trees. From this viewpoint, genus *Armillaria* presents an important subject of research studies. In this study we tried to find evidence for the presence of RNA elements in the respective genus. Total amount of collected strains was 52. CF-11 method for nuclei acids extraction was applied to 40 strains. The method is based on the affinity of cellulose powder for nuclei acids and specifically, the adsorption of dsRNA at ethanol concentrations of 15%. According to our results, there is no evidence for dsRNA elements occurrence in the tested strains. The study was also focused on basic characterization of physiology of isolates, esp. to optimum growth conditions on agar plates and milled straw as well as on rhizomorph formation and fructification. No effect of pH changes and addition of various alcohols on rhizomorph formation was found, while primordia formation was confirmed when selected strains were cultivated on milled straw in the presence of carrot.

Armillaria, dsRNA, rhizomorfy, mykoviry, fruktifikace, CF-11, václavka

Armillaria, dsRNA, rhizomorphs, mycoviruses, fructification, CF-11, honey mushroom

Seznam použitých zkratek

ABV1 <i>Agaricus bisporus</i> virus 1
BBMV broad bean mottle virus
BWYV beet western yellows virus
BYDV barley yellow dwarf virus
CarMV carnation mottle virus
CcOAF cytochrome c oxidase assembly factor
dsRNA double-stranded RNA
ErLV <i>Erysimum</i> latent virus
GIV <i>Giardia lamblia</i> virus
LIV La France infectious virus
MBV mushroom bacilliform virus
MVX mushroom virus X
OMIV-I oyster mushroom isometric virus I
OMIV-II oyster mushroom isometric virus II
OMSV oyster mushroom spherical virus
ORF open reading frame
PEMV pea enation mosaic virus
PLRV potato leafroll virus
PoV1 <i>Pleurotus ostreatus</i> virus 1
RdRp RNA-dependentní RNA-polymeráza
SBMV southern bean mosaic virus
ScV-L-A <i>Saccharomyces cerevisiae</i> virus-L-A
ssRNA single-stranded RNA
UmV <i>Ustilago maydis</i> virus

Obsah

1. Úvod	8
2. Přehled literatury	9
2.1. Rod <i>Armillaria</i>	9
2.2. Obecná charakteristika virů u basidiomycetů	11
2.2.1. Genom a míra patogenity	11
2.2.2. Životní cyklus a šíření virů	11
2.2.3. Klasifikace virů basidiomycetů	12
2.2.4. Oblasti směřování výzkumu virů basidiomycetů	13
2.2.5. Vhodné modelové organismy pro studium virů	14
2.3. Viry u <i>Agaricus bisporus</i>	15
2.3.1. Charakteristika druhu	15
2.3.2. LIV	16
2.3.3. MVX	18
2.3.4. MBV	19
2.3.5. Problematika studia virů u <i>Agaricus bisporus</i>	20
2.4. Viry u <i>Pleurotus ostreatus</i>	21
2.4.1. Charakteristika druhu	21
2.4.2. dsRNA viry u <i>Pleurotus ostreatus</i>	22
2.4.3. OMSV	22
2.5. Viry u <i>Rhizoctonia solani</i>	23
2.5.1. charakteristika druhu	23
2.5.2. dsRNA elementy u <i>Rhizoctonia solani</i>	23
3. Materiál a metody	26
3.1. Kultivace jednotlivých kmenů rodu <i>Armillaria</i>	26
3.1.1. Kultivace kmenů pro testování fyziologických parametrů	27
3.1.1. Kultivace za různého pH	27
3.1.2. Kultivace za různých koncentrací glukózy	27
3.1.3. Kultivace na alkoholech	27
3.1.4. Počítačová analýza fotografií	28
3.1.5 Kultivace pro testování RNA elementů	28
3.2. Izolace nukleových kyselin	28
3.3. Fruktifikace	29

4. Výsledky	30
4.1. Kultivace za různého pH	30
4.2. Kultivace za různých koncentrací glukózy	35
4.3. Kultivace na půdách s různou koncentrací vybraných alkoholů	40
4.4. Kultivace pro analýzu nukleových kyselin	42
4.5. Izolace RNA	42
4.6. Fruktifikace	47
5. Diskuze	47
6. Souhrn	51
7. Seznam citované literatury	52

1. Úvod

Rod *Armillaria* (václavka) zastupuje významnou skupinu organismů. Jedná se o dřevokazné houby, které jsou spoluodpovědné za značné ztráty způsobené v oblastech lesního hospodářství a zemědělství. Boj proti těmto houbám je obtížný, protože dokáží na napadených územích velmi dlouho přežívat v zemi a zasahují někdy území až o velikosti několika desítek hektarů. Velká část výzkumu václavek se proto zaměřuje na boj proti jejich šíření. Jedná se o skupinu hub, která je kosmopolitně rozšířená a v našich zeměpisných šířkách je poměrně hojná. Václavky nicméně patří mezi oblíbené pozdně podzimní jedlé houby, i když u citlivých jedinců mohou vyvolávat gastrointestinální obtíže. Z ekologického hlediska mohou být václavky vhodné pro studium rozšíření mykovirů v přirozených populacích.

Do dnešní doby bylo popsáno několik mykovirů z mnoha různých skupin hub. Pravděpodobně nejvíce prozkoumaný zástupce mykovirů je ScV-L-A ze *Saccharomyces cerevisiae* a s ním spojené satelitní dsRNA. Obecné vlastnosti mykovirů, jako je jejich šíření a vliv na hostitele, byly zkoumány v 70. letech na řadě zástupců ascomycetů (např. rody *Penicillium*, *Aspergillus*). Vůbec první popsany mykovirus pocházel z *Agaricus bisporus*.

Zástupci basidiomycetů nepatřily zpočátku mezi intenzivně zkoumané druhy z hlediska výskytu virů. Nejvíce studovaným byl právě *Agaricus bisporus*. Infekce této houby viry se totiž projevuje množstvím nápadných symptomů. Postupem času byla objevena řada RNA elementů i v jiných basidiomycetech. Většinou však nemají na hostitele žádný účinek. V 80. a polovině 90. let probíhal intenzivní výzkum virů u hospodářsky významných basidiomycetů. Neexistují ale téměř žádné studie o četnosti výskytu mykovirů v přírodě.

Tato práce je tématicky zaměřena jak na studium toho rodu z hlediska fyziologického, tak z hlediska molekulárně biologického. Cílem práce bylo vytvořit pracovní sbírku různých druhů (kmenů) václavek, porovnat vliv určitých fyziologických parametrů na růst a morfologii jednotlivých kmenů, pokusit se vyvolat tvorbu plodnic v umělých podmínkách a zjistit případnou přítomnost RNA elementů.

2. Přehled literatury

2.1. Rod *Armillaria*

Rod *Armillaria* (český název václavka) v sobě zahrnuje skupinu druhů vyšších basidiomycetů kosmopolitně rozšířených po celém světě. Patří mezi dřevokazné houby, jejichž hlavní funkcí v ekosystému je rozklad dřevní hmoty.

Václavky se podílejí na rozkladu mrtvého dřeva, jsou to ale také fakultativní parazité a napadají především oslabené dřeviny, na které působí různé stresové faktory. Ať už se jedná o nepříznivé abiotické faktory (teplota, vlhkost, kontaminace půdy), nebo jde o oslabení způsobené jinými druhy dřevokazných hub a mikroorganismů. Mezi václavkami se ale také vyskytují druhy, které jsou vysoce virulentní a mohou způsobit uschnutí stromů na velkých plochách. V rámci těchto druhů existují kmeny, které se značně liší v míře své virulence (Downer 2004). Z tohoto důvodu představují václavky vážný problém pro lesní hospodářství a zemědělství, zejména sadařství. (Brown 2002). *Armillaria* dokáže napadnout většinu druhů stromů a keřů. Předpokládá se, že infekci jsou schopny odolat pouze tři druhy stromů: *Acer negundo*, *Juglans hindsii*, *Taxus baccata*. Tyto druhy stromů mohou být vysazovány na územích těžce postižených václavkou (Martin 1999).

Boj s výskytem václavky v zemědělských oblastech je nesnadný. Jednou napadené plochy se dají těžko odléčit. Vykácením postižených ploch se neodstraní napadené části kořenů, které zůstávají v půdě. Tyto zbytky pak představují zdroj infekce, který může přetrvávat v půdě dlouhé roky (Cox 2004 *et al.*). Mycelium je teplotně velmi odolné a může přežít i rozsáhlé lesní požáry (Smith *et al.* 1992). Ke kultivaci ploch je nutné odstranit veškeré zbytky kořenů z půdy, které mohou obsahovat živé mycelium hub. Na postižená místa se doporučuje vysázet odolné druhy rostlin. Žádný účinný fungicid proti václavkám není k dispozici. (Downer 2004).

Výskyt václavek není v krajině na první pohled patrný. Jednotlivé organismy mohou vytvářet v půdě velmi rozsáhlou síť mycelií, které zasahují obrovské plochy až v řádech desítek hektarů (Smith *et al.* 1992). Takto postižená území je možno rozeznat pomocí fotografování krajiny z letadel (viz obr. 1.). Na fotografii jsou území postižená václavkou patrná jako světlejší skvrny lesního porostu.



Obr.1

Fotografie smíšených jehličnatých lesů ze západní Montany (převzato z *Armillaria root disease, Williams et al. 1989*)

Nejnápadnějším znakem přítomnosti václavek v prostředí je tvorba plodnic. Ta je časově omezená v našich zeměpisných šířkách na dobu zhruba od začátku září do konce listopadu. V tomto časovém intervalu se tvoří plodnice zhruba po dobu dvou tří týdnů. Začátek fruktifikace je značně variabilní, rok od roku se liší. Závisí na předchozím dlouhodobém vývoji počasí, převážně pak na vlhkosti na konci léta a na nízkých nočních teplotách (Pataky 2000).

Šíření václavek v prostředí probíhá především pomocí rhizomorf. Rhizomorfy jsou svazky mycelií o průměru 0,5 - 3 mm. Na příčném průřezu můžeme u rhizomorf rozeznat vnější (často melanizovanou) kůru a vnitřní dřen skládající se ze svazků mycelia (Rigling *et al.* 2006). Melaninová vrstva představuje ochranu vnitřních svazků mycelia před napadením mikroorganismy a vnějším znečištěním půdy (Fogarty & Tobin 1996). Vnitřní vrstva mycelia slouží k přenosu vody a živin (Lamour *et al.* 2007). Rhizomorfy se mohou větvit monopodiálně nebo dichotomicky (Morrison 2004). Rhizomorfy představují hlavní způsob šíření václavek v prostředí, spory jsou za expanzi odpovědné menší měrou (Cox 2004 *et al.*).

2.2. Obecná charakteristika virů u basidiomycetů

2.2.1. Genom a míra patogenity

Všechny dosud objevené viry v basidiomycetách jsou RNA viry. Naprostá většina těchto virů jsou dsRNA viry. Z basidiomycetů byly izolovány dva ssRNA viry. OMSV z *Pleurotus ostreatus* (Hyun *et al.* 2003) a MBV z *Agaricus bisporus* (Tavantzis *et al.* 1980). Genomy virů objevené v basidiomycetech jsou segmentované i nesegmentované. Většinou se jedná o genomy enkapsidované, ale byly nalezeny i nahé dsRNA elementy u *Agrocybe aegerita* (Barroso & Labarere 1990). Stejně tak nebyla například u všech dsRNA elementů, které byly nalezeny u *Agaricus bisporus*, prokázána přítomnost v izolovaných kapsidách.

Roku 1950 byla u pěstovaných žampionů popsána choroba, která způsobovala citelné ztráty na úrodě. Hollings v roce 1962 označil za původce této choroby virus. Jednalo se o vůbec první popsáný virus hub (Lemke & Nash 1974). Choroba byla podle místa svého největšího rozšíření nazvána *La France disease*. U žampionů se setkáváme asi s nejagresivnějšími projevy houbových virů. A dosud nebyl nalezen žádný kmen *Agaricus bisporus*, který by byl rezistentní proti virům. Naprostá většina všech houbových virů je ale latentních a jejich výskyt v houbách není spojen s žádnými symptomy. U basidiomycetů nebyl popsán žádný virus, který by byl pro svého hostitele smrtící. Tím můžeme vysvětlit, proč byly objeveny tak pozdě.

2.2.2. Životní cyklus a šíření virů

U žádného zástupce viru basidiomycetů nebyly dopodrobna popsány všechny fáze jeho životního cyklu. Poměrně malá část izolovaných dsRNA elementů byla podrobena hlubšímu zkoumání. Přesto můžeme říci, že se u virů basidiomycetů vyskytují všechny strategie exprese genomu, které se obecně vyskytují u RNA virů. Byla popsána tvorba fúzovaných polypeptidů a subgenomových RNA. Při translaci se může uplatňovat ribozomální posun čtecí fáze. Jiný možný mechanismus je sklouznutí ribozómu po AUG kodónu prvního ORF, který se překrývá s následným ORF. Segmentované genomy virů zase umožňují diferenciální translaci

jednotlivých RNA elementů, které kódují jednotlivé proteiny. Pro viry basidiomycetů je obecně charakteristické, že postrádají ve svém životním cyklu extracelulární fázi. Viry nelyzují napadené buňky a nejsou schopny infikovat buňky chráněné buněčnou stěnou (Lemke & Nash 1974).

Viry ke svému šíření využívají schopnost basidiomycetů tvořit anastomózy. Anastomózy jsou propojení mezi hyfami jednotlivých mycelií stejného druhu a umožňují vzájemnou výměnu buněčných obsahů. Jedná se o tzv. horizontální přenos virů. Aby byl tento přenos úspěšný, musí být fúzující mycelia geneticky kompatibilní. Inkompatibilita mycelií představuje jednu z možných přírodních bariér v šíření virů. Nicméně nejedná se o bariéru absolutní a byl prokázán přenos dsRNA elementů u jinak navzájem reprodukčně izolovaných populací *Heterobasidion annosum* (Ihrmark *et al.* 2002). Viry se také mohou šířit pomocí spor. Jde o tzv. vertikální přenos virů. Úspěšnost přenosu virů do spor závisí na typu spor a druhu houby. Přenos dsRNA elementů do nepohlavních spor (konidií), který byl studován u basidiomycetu *Heterobasidion annosum*, probíhá s mnohem menší úspěšností než přenosy dsRNA elementů do konidií u ascomycetů (Ihrmark *et al.* 2004). Naopak přenos dsRNA elementů do basidiospor byl pozorován téměř u všech basidiomycetů. U jednotlivých druhů i izolátů se však setkáváme s rozdíly v úspěšnosti infekce basidiospor. Nabízí se dvojí vysvětlení. Určité druhy hub by mohly disponovat mechanismy, které znesnadňují přenos dsRNA elementů do basidiospor. Tento dosud nepotvrzený předpoklad by byl zajímavým příkladem aktivní obrany basidiomycetů proti šíření virů. Jinou možností je, že úspěšnost infekce basidiospor závisí na koncentraci dsRNA elementů v myceliu. Poměrně častý přenos dsRNA elementů do basidiospor se vyskytuje u hub *Phaffia rhodozyma*, *Agaricus bisporus* a *Rhizoctonia solani* (Ihrmark *et al.* 2004). Naopak u druhu *Agrocybe aegerita* se zatím přenos dsRNA elementů do basidiospor nepodařilo jednoznačně prokázat (Barroso & Labarere 2000).

2.2.3. Klasifikace virů basidiomycetů

Do dnešní doby bylo izolováno z basidiomycetů mnoho různých dsRNA elementů. Na základě funkčních počítačových analýz osekvenovaných dsRNA se podařilo některé objevené viry zařadit do již stávajících skupin houbových virů (*Totiviridae*, *Partitiviridae*, *Barnaviridae*). Srovnávací analýzy nukleotidových a aminokyselinových sekvencí poukázaly na homologie v primární struktuře určitých

proteinů mezi některými houbovými viry a některými skupinami rostlinných virů (např. sobemoviry, bromoviry, luteoviry, tymoviry).

Totiviridae Název této rodiny je odvozen od latinského slova *totus* (nedělený). Viry náležející do této skupin mají genom tvořený jedinou molekulou dsRNA o velikosti 4,6 – 7,0 kbp. Izometrické viriony o průměru 30 – 40 nm obsahují jeden hlavní kapsidový protein o velikosti 70 až 100 kDa (Pospíšek 1998).

Partitiviridae Zahrnuje viry izolované z hub a rostlin. Název je odvozen z latinského slova *partitius* (dělený). Genom partitivirů je tvořen dvěma segmenty dsRNA. Segmenty mají velikost 1,4 až 3,0 kbp. Menší segment kóduje kapsidový protein, větší RNA polymerázu. Izometrické viriony mají 30 – 40 nm v průměru (Pospíšek 1998).

Barnaviridae Tato rodina má jediného zástupce. Jedná se o MBV, jehož hostitelem je *Agaricus bisporus*. Genom je tvořen jedinou molekulou (+) ssRNA o délce 4 kbp (Revill *et al.* 1994). Viriony mají protáhlý tvar o délce 48 – 53 nm a šířce 18 – 20 nm. Jsou složeny z jednoho hlavního kapsidového proteinu o velikosti 24,4 kDa (Pospíšek 1998).

2.2.4. Oblasti směřování výzkumu virů basidiomycetů

Naprostá většina studií virů u basidiomycetů je zaměřena na pěstované jedlé houby. Důvodem je velký negativní dopad objevených virů na produkci těchto hub, a s tím spojených velkých ekonomických ztrát. *Agaricus bisporus* je nejdéle a nejintenzivněji studovaným zástupcem basidiomycetů ohledně výskytu virů.

U této houby bylo poprvé dokázáno, že odpovědnost za nemoc postihující houby nese virus. Do dnešní doby bylo u druhu *Agaricus bisporus* objeveno velké množství různých RNA elementů. Některé tyto elementy byly osekvenovány. Ale pouze u malé části z nich se podařilo určit jejich informační smysl. A stejně tak není zatím jasně určena odpovědnost jednotlivých elementů za konkrétní symptomy choroby. *Agaricus bisporus* může být infikován několika různými virovými entitami současně. Projevy všech těchto virů jsou ale téměř totožné. Z toho důvodu nelze na základě fenotypového projevu choroby určit, jaký virus je za ni odpovědný. Dokonce i patogeni nevirového původu mohou u žampionů vyvolávat choroby, které se svými symptomy podobají těm virovým. Výzkum se proto v tomto případě zaměřuje na jasnou, rychlou a snadnou detekci jednotlivých elementů. V případě vypuknutí epidemie by pak bylo snadné určit, zda je za její

propuknutí odpovědný virus. Případně o který virus se jedná (Romaine & Schlagnhauer 1995). Rychlá a spolehlivá detekce virů je důležitá zejména pro lokalizaci ohnisek nákazy a zamezení dalšímu šíření virové infekce. Infekce se šíří pomocí fragmentů infikovaného mycelia a infikovanými spory.

Viry byly také nalezeny v jiných komerčně pěstovaných houbách. Příkladem může být *Flammulina velutipes*, *Lentinula edodes* a *Pleurotus ostreatus* (Magae & Hayashi 1999). Jedná se o houby zvláště hojně pěstované v Asii. I v těchto případech způsobují virové nákazy často citelné ztráty na úrodě. U těchto druhů je množství objevených RNA elementů zatím menší než u žampionů. Nicméně u *Pleurotus ostreatus* byl objeven v pořadí teprve druhý ssRNA virus basidiomycetů (Hyun *et al.* 2003).

Mezi basidiomycety patří velké množství různých druhů, které parazitují na hospodářsky významných rostlinách. Jedná se především o houby dřevokazné (např. *Heterobasidion annosum*, *Serpula lacrymans*). Ale najdeme zde i zástupce, kteří parazitují na kulturních plodinách např. *Rhizoctonia solani*. Tito parazité představují druhou skupinu basidiomycetů, na které je zaměřen výzkum virů. Doposud nebyl u žádné dřevokazné houby objeven virus, který by jí výraznějším způsobem škodil. A i neinfekčnost houbových virů a jejich omezené možnosti šíření, znesnadňuje jejich potenciální využití v biologickém boji proti dřevokazným houbám. Nicméně v některých provedených studiích u *Heterobasidion annosum* se potvrdilo, že basidiospory obsahující dsRNA elementy mají sníženou klíčivost (Ihrmark *et al.* 2004). Viry by tedy mohly teoreticky znesnadňovat šíření dřevokazných hub. Zatím se ale v přírodě nepodařilo prokázat, že by nějaké druhy dřevokazných hub byly ve svém šíření omezovány viry.

2.2.5. Vhodné modelové organismy pro studium virů

Basidiomycety používané pro studium virů by měly splňovat určitá základní kritéria. Především důležitá je častá tvorba plodnic. Tato podmínka je snadno splnitelná při studiu komerčně pěstovaných hub. Neméně podstatné je, aby nasbírané plodnice pocházely z co možná největšího počtu lokalit. To je důležité zejména pro studium přirozeného výskytu a ekologie virů. Nasbírané plodnice mohou přímo sloužit jako vzorky na analýzu RNA elementů. Tento postup se často používá tehdy, když je potřeba rychle určit přítomnost virů v plodnicích z houbových farem. Z plodnic mohou být také odebrány části plektenchymu, které

se následně pěstují ve vhodných kultivačních mediích. Takto získané a přesně definované laboratorní kmeny se používají například pro studium přenosu RNA elementů mezi jednotlivými izoláty.

S tím souvisí další problematika výběru vhodného druhu basidiomycetu. Úspěšnost pěstování a rychlost růstu závisí na tom, jakou používá daná houba potravní strategii. Relativně nejsnadněji se za laboratorních podmínek pěstují houby dřevokazné. Tyto druhy disponují výkonným enzymatickým aparátem, který rozkládá celulózu a někdy i lignin (tzv. houby bílé hniloby). To jsou velmi stálé a odolné biopolymery. Dřevokazné houby proto dobře rostou na jakémkoli komplexním mediu. Poněkud hůře se za laboratorních podmínek pěstují saprofytní houby. Jejich hlavní nevýhodou je pomalý růst. Nejhorší kultivovatelnými houbami jsou druhy mykorrhizní, které ke svému růstu potřebují často velmi specifické látky. Tyto látky dostávají v přírodě od svých rostlinných symbiontů. Takové specifické podmínky lze ale při laboratorním pěstování těžko zajistit. Studium přenosu virů do basidiospor je ještě obtížnější. Vyžaduje si tvorbu plodnic za laboratorních podmínek. Pouze poměrně malé množství nenáročných druhů basidiomycetů dokáže fruktifikovat v laboratoři. Nalezení vhodných podmínek, za kterých houby tvoří plodnice, může být obtížné a je to úkol často neproveditelný.

2.3. Viry u *Agaricus bisporus*

2.3.1. Charakteristika druhu

Agaricus bisporus je houba v přírodě rostoucí mimo les. Hojně se vyskytuje na hnojených loukách, travnatých pastvinách. Všude kde má dostatečný zdroj dusíku. Vytváří plodnice od května do podzimu. Dnes jsou některé kmeny pěstovány uměle v obrovských množstvích. Jeho hlavní výhoda při pěstování spočívá v tom, že tvoří plodnice i na primárním haploidním myceliu. Klobouk má 5 – 8 cm v průměru. Barva klobouku je bělavá nebo hnědavá. Třeň je bělavý a má přes centimetr v průměru. Má válcovitý tvar o délce zhruba stejné, jako je průměr klobouku. Lupeny jsou v mládí narůžovělé. Postupem času jejich barva hnědne až černá. Výtrusy jsou hnědé. Mají vejčitý tvar o průměru 8 – 9 μm (Velenovský 1920, pod jménem *Psalliota campestris*).

2.3.2. LIV

LIV (La France isometric virus) patří mezi nejintenzivněji studované viry basidiomycetů. Jedná se o enkapsidovaný virus. Virové částice mají 34 nm v průměru. Tento virus je pravděpodobně odpovědný za chorobu zvanou *La France disease* (Van der Lende *et al.* 1995). V postižených plodnicích se nacházejí i částice jiných velikostí. V infikovaných vzorcích bylo nalezeno zpravidla devět někdy deset dsRNA elementů. Van de Lende navrhuje název ABV1 (Agaricus bisporus virus 1), protože dosud nebyl s jistotou určen příčinný vztah tohoto viru k *La France disease*. Označení a velikosti elementů v kpb jsou následující: L1(3,6), L2(3,0), L3(2,8), L4(2,7), L5(2,5), L6(2,35), M1(1,6), M2(1,35), S1(0,86), S2(0,78); (Van der Lende *et al.* 1996). Byly osekvenovány elementy L3, M1, M2 (Harmsen *et al.* 1991); L1, L5 (Van der Lende *et al.* 1996). V purifikovaných virionech byly nalezeny elementy L1, L2, L3, L4, L5, M2. Občas byly doprovázeny dalšími třemi elementy M1, S1, S2 (Van der Lende *et al.* 1994). dsRNA element L6 byl nalezen v nemocných i zdravých plodnicích (Van der Lende *et al.* 1996). Viriony obsahují dva hlavní proteiny o velikostech 90 kDa a 120 kDa a jeden minoritní protein o velikosti 115 kDa (Van der Lende *et al.* 1994).

L1 segment má jeden velký ORF, který obsahuje 1087 aminokyselin. To by teoreticky odpovídalo proteinu o velikosti 121,8 kDa. Funkční počítačová analýza odhalila homologie mezi tímto proteinem a již známými RdRp jiných virů. Největší podobnosti se ukázaly s viry ScV-L-A, UmV a GlV (Van der Lende *et al.* 1996). Tyto viry patří mezi *Totiviridae* (Pospíšek 1998). Do této rodiny ale nemůžeme LIV zařadit. Zástupci této rodiny totiž mají na rozdíl od LIV nesegmentovaný genom. L1 segment tedy kóduje RdRp a odpovídá mu minoritní kapsidový protein o velikosti 115 kDa. I když odvozená aminokyselinová sekvence předpokládala protein o velikosti 121,8 kDa (Van der Lende *et al.* 1994, Van der Lende *et al.* 1996).

L3 segment pravděpodobně kóduje kapsidový protein o velikosti 90 kDa (Harmsen *et al.* 1991). Největší s virionem spojený protein o velikosti 120 kDa je zřejmě kódován L2 segmentem, jediným zbývajícím dsRNA elementem, který má dostatečnou kódovací kapacitu. L5 segment má ORF o 427 aminokyselinách, což by teoreticky odpovídalo proteinu o velikosti 81 kDa. Nebyla zjištěna žádná

homologie mezi tímto domnělým proteinem a známými proteiny (Van der Lende *et al.* 1996).

M2 dsRNA kóduje protein, který byl objeven v cytoplasmě postižených plodnic. Tento protein o velikosti 40 kDa (Harmsen *et al.* 1991) se ale nevyskytuje ve virionech. Funkce tohoto proteinu je neznámá, ale může souviset s rozvojem choroby (Van der Lende *et al.* 1996).

La France disease

La France disease je jedna z nejvážnějších chorob běžně pěstovaných hub. Na rozvoji této nemoci se může podílet více virů. S chorobou ale vždy souvisí 34 nm virové částice. A v postižených houbách bylo většinou nalezeno devět specifických dsRNA elementů. Jde o již výše zmíněný LIV. Občas se v infikovaných plodnicích nachází také tzv. MBV. Je to ssRNA virus (Romaine & Schlagnhauser 1995). Jeho podíl na rozvoji choroby je neznámý. Houbové farmy postižené touto chorobou přicházejí často o celou úrodu. Je rozšířená po celém světě a dá se těžko vymýtit.

Symptomy choroby jsou ve svých důsledcích zodpovědné za snížené výnosy, nebo až za úplnou neprodejnost vypěstovaných hub. Mycelium roste na záhonech pomalu. Na záhonech se také tvoří holá místa. Vyskytují se různé malformace plodnic. Obecně je choroba nebezpečná hlavně při první fázi pěstování, kdy na substrátu klíčí čerstvě naočkované mycelium. Pokud dojde k infekci později, je celý průběh nemoci už mírnější. Choroba se šíří pomocí fragmentů infikovaného mycelia a pomocí infikovaných spor (Irvine & Moran 1999).

Proti chorobě se bojuje zpřísněním hygienických pravidel na houbových farmách. Důležité je hlavně důsledné oddělení jednotlivých fází pěstování tak, aby mezi nimi nedocházelo k přenosu spor a mycelia. Proto se na farmách používají různé filtry ve vzduchotechnice a těsnění na dveřích, které zamezují vzájemným kontaminacím z jednotlivých místností. Nový substrát se musí před vlastním zaočkováním zbavit všech nežádoucích houbových spor. To se provádí sterilizací při 65 °C po dobu 16 hodin. Dodržení tohoto postupu je důležité, protože právě infekce při klíčení mycelia způsobuje často ztrátu celé úrody. Jako účinné se osvědčily i některé změny ve výrobních postupech. Dnes například výroba substrátu a vlastní pěstování probíhá v oddělených provozech.

2.3.3. MVX

V polovině 90. let se v Britanii na houbových farmách objevila nová choroba. Symptomy byly podobné jako u *La France disease*, ale komerční test na 34 nm virus byl negativní. Ukázalo se, že příčinou choroby jsou nové dsRNA elementy (Gaze *et al.* 2000). Choroba byla nazvána mushroom virus X (MVX). Z velkého množství vzorků odebraných v různých místech postižení bylo izolováno celkem 26 druhů dsRNA elementů. Jejich velikost se pohybovala v rozmezí od 640 bp do 20,2 kbp. Většina z těchto elementů nebyla nikdy předtím u *Agaricus bisporus* popsána.

Tyto elementy byly odpovědné za velké množství symptomů, z nichž některé se podobaly těm u *La France disease*. Ale objevily se zde i symptomy zcela nové. Příkladem může být hnědé zbarvení plodnic u jinak bílých kmenů žampionů. V jiných případech zase plodnice ztratily barvu. Tyto symptomy se nikdy nevyskytly u *La France disease*. Takto znehodnocené houby nemohly přijít do prodeje. Postižení bylo na různých místech odlišné. V některých oblastech se vyskytlo jen málo příznaků. Jiné oblasti byly těžce zasaženy a objevovaly se tam malformace plodnic jako při *La France disease*. Na takových místech docházelo k velkým ztrátám na úrodě. Vzorky z různých oblastí byly podrobeny analýze na výskyt dsRNA elementů. Získané dsRNA profily se lišily podle místa odběru. Frekvence výskytu jednotlivých druhů dsRNA byly různé. Z 26 dsRNA se tři elementy běžně vyskytovaly i u asymptomatických vzorků. Tyto elementy mají velikost 16,2 kbp, 9,4 kbp a 2,4 kbp. Čtyři nejmenší dsRNA elementy o velikosti 2,0 kbp, 1,8 kbp, 0,8 kbp a 0,6 kbp byly vždy nalezeny ve spojitosti s hnědnutím plodnic. Pouze u těchto čtyř druhů RNA se podařilo určit jejich spojitost s nějakým symptomem. MVX se šíří podobně jako LIV infikovaným myceliem a sporami. Stejně tak obrana proti MVX se podobá obraně proti *La France disease* a její podstatou je zpřísnění hygienických pravidel na postižených farmách.

Mezi MVX a LIV existují významné rozdíly. LIV je enkapsidovaný virus, který je vždy spojený s devíti určitými dsRNA elementy a choroba *La France disease* je po symptomatické stránce jasně definovaná. Naproti tomu houby postižené MVX obsahují různé profily dsRNA elementů. Stejně tak kombinace možných symptomů jsou variabilní. U MVX se zatím nepodařilo objevit virion, který by se vyskytoval společně s těmito elementy. Celková šíře dsRNA elementů, které se vyskytují u MVX, je větší než množství dsRNA elementů spojených s LIV. dsRNA elementy

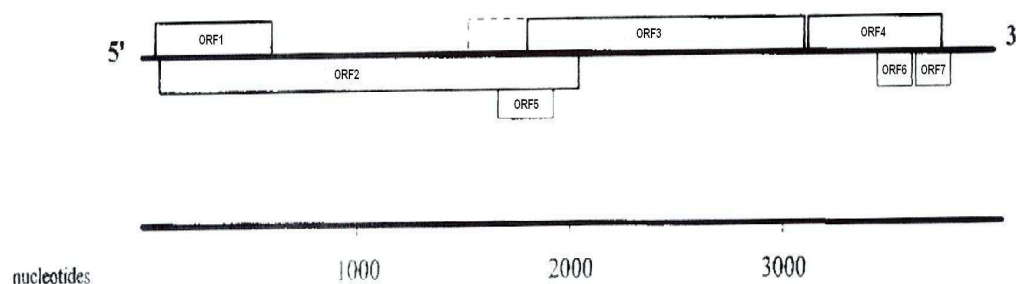
LIV se v cytoplasmě vyskytují v mnohem větších koncentracích než dsRNA elementy MVX. To může být jedna z příčin, proč byly tyto elementy objeveny tak pozdě. Velké množství dsRNA elementů u MVX naznačuje, že se jedná o více než jeden virus (Grogan *et al.* 2003).

2.3.4. MBV

MBV (mushroom bacilliform virus) byl objeven roku 1980. Dlouho byl považován za jediného zástupce (+) ssRNA virů u basidiomycetů. Je jediným zástupcem rodiny *Barnaviridae* (Pospíšek 1998). Má nesegmentovaný genom o délce 4009 nukleotidů (Revill *et al.* 1994). Virion má rozměry 19×50 nm. Virus se nalézá v plodnicích postižených *La France disease* spolu s LIV. Genom kóduje sedm ORF (viz obr.2). Na 5' konci má navázaný Vpg protein. V mnohých ohledech je podobný některým rostlinným virům, které patří mezi luteoviry a sobemoviry. MBV má neobvykle organizovaný genom. Posloupnost jím kódovaných proteinů od 5' konce k 3' konci je proteáza-Vpg-polymeráza. Toto genomové uspořádání je u ssRNA virů poměrně vzácné a mnohem častěji se u nich vyskytuje uspořádání Vpg-proteáza-polymeráza. Stejnou genomovou organizaci jako MBV má například PLRV, který patří mezi luteoviry. Velikost Vpg proteinu MBV je zase podobná jinému luteoviru a sice BYDV (Revill *et al.* 1998).

ORF1 a ORF2 se na 5' konci překrývají. ORF1 kóduje polypeptid o velikost 21 kDa, ORF2 kóduje protein o velikosti 72 kDa. U tohoto proteinu byla zjištěna přítomnost motivu serinové proteázy. Tento protein pravděpodobně autokatalyticky vyštěpuje Vpg. Ale zatím to nebylo potvrzeno přímým pozorováním. Podobné motivy serinových proteáz byly nalezeny u luteovirů BWYV, PEMV a sobemoviru SBMV. Při translaci ORF2 se nejspíše uplatňuje strategie sklouznutí RdRp po AUG ORF1 tak, aby se mohl translatovat i ORF2 (Revill *et al.* 1998). ORF3 obsahuje sekvenční motiv SGxxxTxxxNTxxNx_nGDD, kde x značí libovolnou aminokyselinu. Tento motiv je důležitý pro replikaci RNA (Pospíšek 1998). Tato sekvence se vyskytuje u RdRp mnohých rostlinných virů ze skupiny luteovirů a sobemovirů. ORF3 se na svém začátku překrývá s ORF2 a jeho čtecí fáze má vůči ORF2 -1 posun. ORF3 (polymerázový gen) je pravděpodobně exprimován -1 ribozomálním posunem čtecí fáze (Revill *et al.* 1994). Tento mechanismus si vyžaduje dvě specifické oblasti na molekule RNA. První je tzv. *slippery site*, což je sedminukleotidová sekvence, která umožňuje sklouznutí ribozómu o jednu bázi

zpět takovým způsobem, aby po tomto skluzu bylo zachováno správné párování na prvním i druhém místě kodónu. Druhou oblastí je vlásenková struktura se smyčkou. Tato struktura dokáže na chvíli zastavit pohyb ribozómu po RNA právě v místě *slippery site*, což umožní skluz o jednu bázi vzad. Pro fungování tohoto mechanismu je velmi důležitá vzdálenost mezi *slippery site* a vlásenkovou strukturou. Jen specifická vzdálenost mezi těmito dvěma místy totiž zajistí zastavení ribozómu právě na *slippery site* (Pospíšek 1998). ORF4 na 3' konci genomu kóduje kapsidový protein o velikosti 22 kDa. Kapsidový protein je zřejmě translatován ze subgenomové RNA. Tato RNA má velikost asi 0,9 kb (Revill *et al.* 1999). Tuto hypotézu podporují určité podobnosti mezi MBV a CarMV. Existují sekvenční homologie mezi kapsidovými proteiny těchto dvou virů. Kapsidový protein CarMV je translatován ze subgenomové RNA. Délka genomu tohoto viru je 4003 nukleotidů. To je téměř stejné jako u MBV. 5'a 3' nekódující oblasti těchto dvou virů jsou sekvenčně podobné (Revill *et al.* 1994).



Obr. 2. Genom a uspořádání ORF u MBV, (převzato z Revill *et al.* 1994)

MBV byl vždy nalézán ve spojitosti s *La France disease*. Ve zdravých plodnicích se nevyskytoval. Jeho přítomnost ale nebyla zjištěna ve všech případech *La France disease*. MBV byl proto považován za satelitní virus jednoho z virů způsobujícího tuto chorobu. Nejčastěji byl spojován s LIV. Není určen ani jeho podíl na rozvoji choroby (Revill *et al.* 1999). Nicméně někteří autoři uvádějí, že se jim podařilo izolovat MBV ze zdravých plodnic, které nebyly postiženy *La France disease* (Romaine & Schlagnhauer 1995). To by představovalo první důkaz o nezávislosti replikace MBV a také o tom, že MBV je asymptomatický virus.

2.3.5. Problematika studia virů u *Agaricus bisporus*

U *Agaricus bisporus* bylo nalezeno mnoho různých dsRNA elementů a virových částic. Jen malé množství z těchto elementů bylo osekvenováno. Příslušnost

jednotlivých elementů k určitým virionům je také často neznámá. Velikost jednotlivých elementů odhadnutá po elektroforetickém rozdělení se u jednotlivých studií mírně odlišují. A je dosti možné, že některé dsRNA elementy podobných velikostí představují vlastně jeden druh RNA (Grogan *et al.* 2003). Dále se například ukázalo, že S3 segment vyskytující se při *La France disease* je vnitřně deletovanou variantou M2 segmentu (Harmsen *et al.* 1991). Bylo nalezeno poměrně velké množství dsRNA elementů, které se vyskytují ve zdravých i nemocných plodnicích a nemají žádný negativní vliv na růst houby. U elementů vyskytujících se jen u nemocných plodnic, nebyla většinou určena jejich přímá odpovědnost za nějaký symptom. Toto všechno zatím dává velmi chabou představu o mechanismech podílejících se na etiologii *La France disease*. Jedno z množných vysvětlení spočívá v rozdílnosti kodónových sad používaných virovými geny a hostitelem. Během vytváření plodnic se u houby výrazně zvyšuje syntéza proteinů. To sebou přináší i velkou utilizaci aminoacyl-tRNA. Tvorba virových proteinů může snižovat koncentraci vzácných aminoacyl-tRNA využívaných hostitelem až na takovou úroveň, která je nedostatečná pro translaci hostitelských mRNA. To může v konečném důsledku způsobovat malformace plodnic. Zároveň to naznačuje, že za symptomy choroby je odpovědná spíše replikace viru, než jeho pouhá přítomnost v buňkách (Van der Lende *et al.* 1996).

2.4. Viry u *Pleurotus ostreatus*

2.4.1. Charakteristika druhu

Pleurotus ostreatus je dřevokazná houba rostoucí na pařezech a kmenech listnatých stromů. Plodnice vyrůstají v trsech od října do března. Na povrchu jsou bělavé až šedavé. Lupeny jsou bílé. Výtrusy mají bílou barvu, válcovitý tvar a jsou velké 8 – 10 μm (Velenovský 1920). Klobouk má v průměru 6 – 18 cm. Třeň je krátký a bělavý. Spolu žampiony patří k často pěstovaným houbám. Zvláště hojně se pěstuje v Asii. Její pěstování je technologicky méně náročné než u *Agaricus bisporus*. Roste na různých biologických odpadech (např. piliny, sláma). Pěstuje se také na dřevěných špalcích.

2.4.2. dsRNA viry u *Pleurotus ostreatus*

Z *Pleurotus ostreatus* bylo izolováno několik druhů izometrických virových částic. Tyto částice se navzájem lišily svou velikostí a obsahem RNA molekul. PoV1 má genom tvořený dvěma molekulami dsRNA. Virové částice mají v průměru asi 30 nm. dsRNA-1 má 2296 nukleotidů a kóduje protein o velikosti 82,2 kDa. dsRNA-2 má 2223 nukleotidů a kóduje protein o velikosti 71,7 kDa. Větší segment kóduje pravděpodobně RdRp, menší zřejmě kóduje kapsidový protein. Sekvence těchto dvou předpokládaných proteinů vykazuje homologii s RdRp a kapsidovým proteinem partitivirů (Lim *et al.* 2005).

OMIV-I je virus s kapsidou o průměru 34 nm. Obsahuje dvanáct různých dsRNA molekul. Kapsidový protein má velikost 71 kDa. Tento virus byl vždy nalezen ve spojitosti s OMSV. OMIV-II má stejnou velikost jako OMIV-I (34 nm). Kapsida obsahuje tři dsRNA elementy. Dva z těchto elementů se vyskytují i v OMIV-I. Kapsidový protein má velikost 62 kDa (Hyun *et al.* 2004). Van der Lende izoloval z plodnic virové částice. Ty obsahovaly tři dsRNA molekuly. Bylo prokázáno, že tyto elementy jsou odpovědné za sníženou rychlost růstu. Byl prokázán i přenos těchto elementů mezi dvěma mycelii skrz anastomózy (Van der Lende *et al.* 1995). Všechny tyto tři dsRNA elementy se vyskytovaly i u OMIV-I.

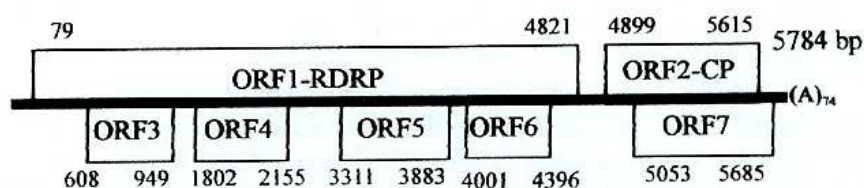
Určení přesné identity všech těchto virových částic bude předmětem dalšího výzkumu. Nápadné podobnosti mezi velikostmi kapsid a obsahem RNA naznačují, že tyto viry jsou spíše různými formami jednoho druhu viru.

2.4.3. OMSV

OMSV (oyster mushroom spherical virus) byl nedávno objeven jako teprve druhý zástupce (+) ssRNA virů u basidiomycetů. Sférický virion má průměr 27 nm a je tvořen kapsidovým proteinem o velikosti 28,5 kDa. Genom je tvořen jedinou molekulou (+) ssRNA o délce 5,78 kb. Na 3' konci genomu je poly(A) úsek o délce 74 nukleotidů. Nukleotidová sekvence odhalila přítomnost sedmi ORF (viz obr 3.). Tento virus je pravděpodobně zodpovědný za chorobu zvanou *oyster mushroom Die-back disease*. Tato choroba se velmi rychle šíří a její propuknutí často způsobí ztrátu celé úrody. OMSV byl izolován pouze z napadených plodnic a ve zdravých plodnicích se nenachází.

ORF1 představuje nejdelší gen. Zabírá celých 83 % genomu. Kóduje protein o velikosti 174 kDa. Aminokyselinová sekvence tohoto proteinu vykazuje homologie

se sekvencemi RdRp některých rostlinných virů. Největší sekvenční podobnost vykazuje OMSV s ErLV, který patří mezi tymoviry. ORF2 je umístěný na 3' konci genomu. Po ORF1 je druhý největší a kóduje protein o velikosti 28,5 kDa. Jedná se o kapsidový protein. Tento protein nevykazuje žádnou homologii s jiným známým proteinem. Celkově má OMSV nejbližší k tymovirům. Nemá žádnou podobnost v organizaci genomu s MBV (Hyun *et al.* 2003). Nedávno se ukázalo, že by ve virové částici mohly být dvě molekuly ssRNA (Hyun *et al.* 2004).



Obr. 3. Genom a uspořádání ORF u OMSV, (převzato z Hyun *et al.* 2003)

2.5. Viry u *Rhizoctonia solani*

2.5.1. Charakteristika druhu

Rhizoctonia solani je významný parazit brambor a mnoha jiných kulturních plodin. Vytváří velké množství kmenů s rozdílnou hostitelskou specializací i infekčností. Na povrchu bramborových hlíz vytváří nápadná sklerocia. Pomocí sklerocií houba přezimuje. Napadené rostliny vytvářejí deformované hlízy. Při silném napadení vznikají hlízy nad zemí v paždí listů. Houba postupně způsobuje nekrózy podzemních částí rostliny. Také dochází ke žloutnutí a svinování vrcholových listů.

2.5.2. dsRNA elementy u *Rhizoctonia solani*

Rhizoctonia solani tvoří mnoho populací geneticky odlišných skupin, které se specializují na různé hostitele. Do dnešní doby bylo v různých skupinách nalezeno velké množství dsRNA elementů. Jednotlivé izoláty z určitých skupin obsahovaly navzájem odlišné profily RNA elementů (Bharathan *et al.* 2005). Byl zkoumán podíl RNA molekul na míru patogenity *Rhizoctonia solani* vůči jejím hostitelům. Výsledky se v jednotlivých pozorováních lišily. Některé výzkumy ukazovaly na zvýšení virulence *Rhizoctonia solani* v důsledku přítomnosti dsRNA molekul. Jiné

zase naznačovaly, že za hypovirulenci některých kmenů *Rhizoctonia solani* mohou právě dsRNA elementy. Vysvětlení těchto rozdílných zjištění spočívá ve velké variabilitě jak genotypů jednotlivých zkoumaných kmenů, tak v nich nalezených RNA molekul (Jian *et al.* 1998).

Zkoumání virulentního kmene Rhs1AP a od něj odvozených nevirulentních kmenů Rhs1A1, Rhs1A2 a Rhs1A3 odhalila přítomnost RNA elementů, které mohou být zodpovědné jak za zvýšení virulence, tak za hypovirulenci (Lakshman & Tavantzis 1994; Strauss *et al.* 2000). Kmen Rhs1AP obsahoval dva segmenty dsRNA o velikosti 23 kbp (tzv. L2 segment) a 6,5 kbp (tzv. M1 segment). Zatímco hypovirulentní kmen Rhs1A1 obsahoval další tři elementy o velikosti 25 kbp, 3,6 kbp (tzv. segment M2) a 1,2 kbp. Kmeny Rhs1A2 a Rhs1A3 vykazovaly snížený růst a postrádaly segmenty L2 a M1. RNA molekula o velikosti 1,2 kbp se nacházela ve všech kmenech odvozených od Rhs1AP (Lakshman & Tavantzis 1994). Další výzkum se zaměřil na segmenty M1 a M2. U M2 segmentu se předpokládá, že je zodpovědný za hypovirulenci *Rhizoctonia solani*. M1 segment je zase považován za původce zvýšené virulence této houby.

M2 segment byl nalezen v cytoplasmě a mitochondriích. Ukázalo se, že genom *Rhizoctonia solani* v sobě obsahuje DNA kopii tohoto elementu. Sekvence jednoho řetězce kóduje protein, který má v sobě motivy RdRp. Tento protein také vykazuje význačnou sekvenční podobnost se dvěma doménami pentafunkčního proteinu, který katalyzuje pět centrálních kroků šikimátové dráhy u kvasinek a vláknitých hub (Lakshman *et al.* 1998). Šikimátová dráha se vyskytuje u rostlin a mikroorganismů. Je nezbytná pro tvorbu aromatických sloučenin, které se uplatňují v primárním metabolismu (např. aromatické aminokyseliny); (Coggins *et al.* 2003).

M1 segment se také nachází v cytoplasmě a mitochondriích. M1 má šest ORF (obr. 4.). Největší je ORF2 na (+) řetězci. Jedná se o helikázový gen, který kóduje protein o velikosti 199 kDa. Tento protein má význačnou podobnost s A1 proteinem BBMV, který patří mezi bromoviry. ORF5 na (–) řetězci tvoří komplementární úsek k části ORF2. Tento ORF kóduje protein, který vykazuje značnou podobnost k CcOAF. CcOAF je pokládán za chaperonin. Pomáhá ke správnému sbalení podjednotkám cytochrom oxidázy. Toto naznačuje možný původ části M1 segmentu z mitochondriálního genomu, který nese elektrontransportní geny. M1 segment nenese žádný motiv RdRp, ale vždy se vyskytuje společně s L2 segmentem. Sekvenční analýza tohoto segmentu odhalila přítomnost motivů, které

se vyskytují u RdRp. To by mohlo naznačovat, že M1 je svojí replikací závislý na L2 (Jian *et al.* 1998). Sekvenční motivy nalezené u M1 a M2 segmentů, které vykazují podobnost s určitými buněčnými geny, mohou podporovat hypotézu evoluce RNA virů hub a rostlin z těchto genů.



Obr. 4. Uspořádání ORF u segmentu M1 izolovaného z *Rhizoctonia solani* (převzato z Jian *et al.* 1998)

3. Materiál a metody

3.1. Kultivace jednotlivých kmenů rodu

Armillaria

Jednotlivé kmeny použité v této práci pro testování přítomnosti RNA elementů a pro testování jednotlivých fyziologických parametrů ovlivňujících růst pocházejí jednak z vlastních sběrů a jednak se sbírky kmenů václavek na Mendelově zemědělské a lesnické univerzitě v Brně (viz Tab. 1). Veškeré kmeny byly kultivovány při 25 °C jako optimální teplotě pro růst václavek (Jankovský & Scháněl 1999).

č. kmene	druh	původ	č. kmene	druh	původ
A1	<i>A. gallica</i>	Krčský les (Praha)	A513	<i>A. cepistipes</i>	MZLU Brno
A4	<i>A. gallica</i>	Krčský les (Praha)	A518	<i>A. cepistipes</i>	MZLU Brno
A5	<i>A. ostoyae</i>	Krčský les (Praha)	A520	<i>A. tabescens</i>	MZLU Brno
A6	<i>A. gallica</i>	Krčský les (Praha)	A524	<i>A. cepistipes</i>	MZLU Brno
A7	<i>A. gallica</i>	Krčský les (Praha)	A532	<i>A. ostoyae</i>	MZLU Brno
A8	<i>A. cepistipes</i>	Krčský les (Praha)	A535	<i>A. cepistipes</i>	MZLU Brno
A10	<i>A. gallica</i>	Krčský les (Praha)	A537	<i>A. ostoyae</i>	MZLU Brno
A11	<i>A. gallica</i>	Hradec Králové	A538	<i>A. ostoyae</i>	MZLU Brno
A15	<i>A. sp.</i>	Říčany	A540	<i>A. cepistipes</i>	MZLU Brno
A16	<i>A. sp.</i>	Jevany	A549	<i>A. ostoyae</i>	MZLU Brno
A19	<i>A. sp.</i>	Dojetřice	A550	<i>A. gallica</i>	MZLU Brno
A21	<i>A. sp.</i>	Blažim	A555	<i>A. gallica</i>	MZLU Brno
A22	<i>A. sp.</i>	Kytín	A556	<i>A. ostoyae</i>	MZLU Brno
A25	<i>A. sp.</i>	Kozí hory	A560	<i>A. ostoyae</i>	MZLU Brno
A26	<i>A. sp.</i>	Obory	A565	<i>A. ostoyae</i>	MZLU Brno
A27	<i>A. sp.</i>	Buda	A566	<i>A. gallica</i>	MZLU Brno
A28	<i>A. sp.</i>	Nepřejov	A567	<i>A. ostoyae</i>	MZLU Brno
A29	<i>A. sp.</i>	Solenice	A575	<i>A. gallica</i>	MZLU Brno
A30	<i>A. sp.</i>	Praha Bubeneč	A577	<i>A. gallica</i>	MZLU Brno
A31	<i>A. sp.</i>	Hejnice	A580	<i>A. ostoyae</i>	MZLU Brno
A32	<i>A. sp.</i>	Ještěd	A584	<i>A. cepistipes</i>	MZLU Brno
A33	<i>A. sp.</i>	Tábor	A585	<i>A. cepistipes</i>	MZLU Brno
A34	<i>A. sp.</i>	Teplice	A587	<i>A. ostoyae</i>	MZLU Brno
A35	<i>A. sp.</i>	Nový Hrádek	A593	<i>A. gallica</i>	MZLU Brno
A509	<i>A. cepistipes</i>	MZLU Brno	A626	<i>A. gallica</i>	MZLU Brno
A511	<i>A. cepistipes</i>	MZLU Brno	A640	<i>A. gallica</i>	MZLU Brno

Tab. 1 seznam použitých kmenů pro jednotlivé experimenty

3.1.1. Kultivace kmenů pro testování fyziologických parametrů

Pro veškeré fyziologické experimenty bylo použito pevné agarové HN-HC medium [vínan amonný 2 g/l, D-glukóza 20 g/l, KH_2PO_4 1 g/l, NaH_2PO_4 0,2 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/l, stopové prvky: 25 ml/l (složení: CaCl_2 2 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g/l, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,4 g/l, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l)]. Jednotlivé kmeny byly u všech experimentů očkované na Petriho misky (Ø 9cm). Všechny misky byly fotografovány na prosvětlovací desce (Fomei, Light box LP130) fotoaparátem (Konica Minolta Dimage X1) v intervalech jednoho týdne po dobu celkem tří týdnů. Pořízené fotografie byly analyzovány počítačovým programem Area Counter.

3.1.2. Kultivace za různého pH

Bylo připraveno pevné agarové HN-HC medium o hodnotách pH 5, 6, 7, 8. Testovány byly kmeny A 566 (*A. gallica*), A 535 (*A. cepistipes*), A 580 (*A. ostoyae*). Všechny kmeny pro každou hodnotu pH, byly očkované ve třech paralelách. Inokulum tvořil agarový terčík o průměru 0,5 cm.

3.1.3. Kultivace za různých koncentrací glukózy

Bylo připraveno pevné agarové medium o koncentracích glukózy 0 g/l, 10 g/l, 20 g/l, 30 g/l, 40 g/l, 50 g/l. Testovány byly kmeny A 550 (*A. gallica*), A 513 (*A. cepistipes*), A 565 (*A. ostoyae*). Všechny kmeny byly pro každou koncentraci glukózy naočkované na Petriho misky ve třech paralelách. Inokulum tvořil agarový terčík o průměru 0,5 cm.

3.1.4. Kultivace na alkoholech

Byly testovány kmeny A 566 (*A. gallica*), A 535 (*A. cepistipes*), A 580 (*A. ostoyae*). Do každé Petriho misky bylo napipetováno 20 ml horkého agarového HN-HC media. Po dvou dnech byly do Petriho misek pipetovány alkoholy o koncentracích 0 ppm, 100 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm (Weinhold 1963). Byly použity alkoholy metanol, etanol, isopropanol, isobutanol ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$). Vodné roztoky těchto alkoholů byly vysterilizovány gama zářením dávkou 25 (kGy). Do každé misky bylo napipetováno 2 ml roztoku příslušného alkoholu o příslušné

koncentraci. Všechny kmeny byly pro každý alkohol a každou koncentraci naočkovány ve třech paralelách. Inokulum tvořil agarový terčík o průměru 0,5 cm.

3.1.5. Počítačová analýza fotografií

Ke stanovení obsahu plochy Petriho misek porostlé jednotlivými kmeny byl použit program Area Counter. Autorem tohoto programu je Bc. Tomáš Větrovský. Tento grafický editor určuje procentuální poměr vymezené plochy bitmapy pomocí integrace jejích pixelů. Princip programu spočívá v označení zkoumané plochy obrázku (fotografie), popřípadě označení oblasti, jenž do výpočtu zahrnuta být nemá, uživatelem pomocí jednoduchých kreslících nástrojů, dále v následném sečtení bodů této plochy a porovnání s celkovou velikostí obrázku, případně sníženou o nežádoucí oblast. Aplikace tohoto programu byla koncipována především pro analýzu fotografií plochy rostoucího mycelia a následné sestavení růstových křivek

3.1.6. Kultivace pro testování RNA elementů

Jednotlivé kmeny byly pěstovány na dvou komplexních tekutých médiích. GC medium (glukóza 20 g/l, kukuřičný extrakt 7 g/l), ME medium (20 g malt extrakt). U obou medií bylo pH upraveno pomocí 5 M roztoku NaOH na hodnotu 5,5.

Každý kmen byl kultivován paralelně ve třech 500 ml Erlenmayerových baňkách, v každé baňce bylo 100 ml media. Každá baňka byla naočkována čtyřmi kousky inokula z pevných agarových půd obsahující stejné komplexní medium. Kultivace probíhala tři týdny. První týden probíhala kultivace submersním způsobem, aby došlo k rozmělnění inokula na více částí. Následující dva týdny probíhala kultivace staticky. Po skončení kultivace byla narostlá biomasa propláchnuta v destilované vodě a vzorky byly zamrazeny v -80 °C. Před vlastní analýzou nukleových kyselin byly vzorky lyofilizovány po dobu 3 – 4 dnů (Grogan *et. al.* 2003).

3.2. Izolace nukleových kyselin

Všechny pufrы a reagenty byly připraveny z RNA-free vody, u které byla RNázová aktivita odstraněna použitím dimetylpyrokarbonátu. Lyofilizované zamražené vzorky byly rozdrceny v tekutém dusíku ve třecí misce spolu s malým

množstvím práškového Al_2O_3 (Ihrmark *et al.* 2001). Na každý gram rozdrceného vzorku bylo přidáno 5 ml $2 \times$ STE pufru (0,2 M NaCl, 0,1 M Tris, 2 mM EDTA). Směs byla homogenizována. Ke směsi byl přidán $1 \times$ objem saturovaného fenolu (pH 4,5). Směs byla centrifugována 20 min při 4300 rpm (4 °C). Vodná fáze byla odebrána pomocí pipety bylo k ní přidáno $0,5 \times$ objemu fenolu (pH 4,5) a $0,5 \times$ objemu chloroformu. Směs byla centrifugována 20 minut při 4300 rpm (4 °C). Opět byla odebrána vodná fáze a byl k ní přidán $1 \times$ objem chloroformu. Následovala centrifugace 20 minut při 4300 rpm (4 °C). K vodné fázi byl přidán 96% etanol, tak aby výsledná koncentrace etanolu v roztoku byla 15%. K roztoku byla přidána prášková celulóza CF-11 (Whatman) (0,5 g/10 ml supernatantu). Při této koncentraci etanolu v roztoku se na celulózu přednostně váže dsRNA, zatímco ssRNA a DNA zůstávají volně v roztoku a mohou být odstraněny promytím. (Morris & Dodds 1979). Směs byla promíchávána po dobu 10 minut při 4 °C. Tato směs pak byla nanášena na kolonku (Biorad) a byla proplachována 50 ml STE-15 puforem (0,1 M NaCl, 0,05 M Tris, 1 mM EDTA, 15% v/v EtOH). dsRNA pak byla uvolněna z celulózy promytím 10 ml čistého STE pufru. Nukleové kyseliny byly vysráženy pomocí $2,5 \times$ objemu 96% etanolu $0,1 \times$ objemu 3 M acetátu sodného. Precipitace probíhala přes noc při -20 °C. Vzorky pak byly centrifugovány 40 min při 4300 rpm (4 °C). Pelety byly propláchnuty 1 ml 70 % etanolu. Směs byla opět centrifugována 30 minut při 4300 rpm (4 °C). Pelety byly vysušeny na vzduchu a byly rozpuštěny ve 100 μl RNA-free ddH₂O. Vzorky byly analyzovány elektroforeticky v 0,9 % w/v agarózovém gelu v $1 \times$ TAE pufru (0,04 M Tris-acetát, 1 mM EDTA) (Masek *et.al.* 2004). Do každé jamky bylo napipetováno 20 μl vzorku. Jako standart velikosti nukleových kyselin byly použity markery: marker λ DNA/Eco91I, marker 1000bp/DNA Ladder plus. Vzorky byly barveny pomocí Syber Gold. Elektroforéza probíhala 1h při 70 V. Gely po elektroforéze byly vyfotografovány a fotografie byly zpracovány pomocí programu 1D Image analysis, verze 3.6.1 (Kodak).

3.3. Fruktifikace

Při pokusu o fruktifikaci bylo jako medium použit substrát o následujícím složení.
brézové piliny : pšeničné otruby : voda v poměru 2,2 : 1 : 1,5 (Togashi 1996)

Substrátem byly naplněny 250 ml Erlenmayerovy baňky do jedné třetiny. Do jedné poloviny těchto baněk bylo přidáno 5 g strouhané mrkve. Tento substrát byl autoklávován dvakrát v 24 hodinovém intervalu mezi jednotlivými sterilizacemi. Jednotlivé baňky byly inokulovány z Petriho misek kmeny A535, A580, A566 (každý kmen byl očkován dvakrát, jednou se strouhanou mrkví, po druhé bez) a inkubovány jeden měsíc při teplotě 25 °C. Po této době byly přeneseny do fytotronu s nastavitelným světelným a tepelným režimem, kde probíhala kultivace za 16 °C při periodické změně osvětlení po 12 hodinách.

4. Výsledky

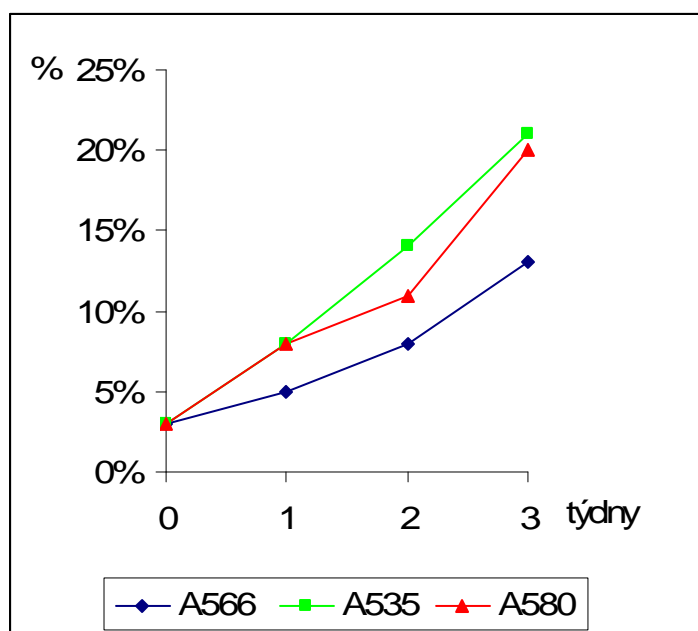
Uvedené tabulky a grafy shrnují jednotlivé výsledky, které jsou dále podrobněji diskutovány v části Diskuze.

4.1. Kultivace za různého pH

	pH 5		
kmen/týdny	1.	2.	3.
A566	4%	7%	11%
	6%	8%	15%
	5%	8%	13%
průměr	5%±0,8	8%±0,4	13%±1,6
A535	6%	13%	19%
	10%	15%	24%
	7%	13%	21%
průměr	8%±1,7	14%±0,9	21%±2
A580	9%	11%	19%
	8%	12%	21%
	7%	10%	19%
průměr	8%±0,8	11%±0,8	20%±0,9

Tab. 2

Procentuální vyjádření obsahu porostlé plochy Petriho misek u kmenů A 566 (*A. gallica*), A 535 (*A. cepistipes*), A 580 (*A. ostoyae*) při pH 5



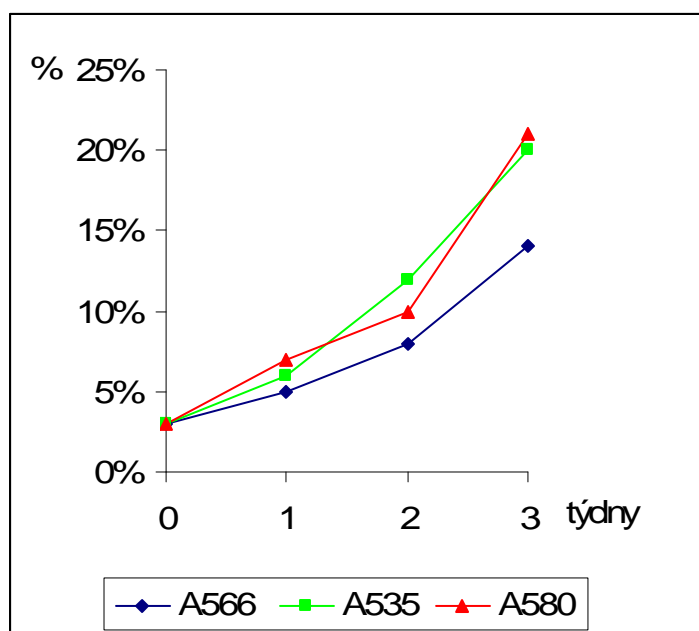
Graf 1

Grafické znázornění rychlosti růstu kmenů A 566 (*A. gallica*), A 535 (*A. cepistipes*), A 580 (*A. ostoyae*) na živné půdě při pH 5

	pH 6		
kmen/týdny	1.	2.	3.
A566	4%	7%	12%
	6%	9%	15%
	5%	9%	14%
průměr	5%±0,8	8%±0,9	14%±1,2
A535	5%	14%	19%
	7%	11%	22%
	7%	12%	20%
průměr	6%±0,9	12%±1,2	20%±1,2
A580	6%	11%	20%
	8%	9%	22%
	6%	10%	20%
průměr	7%±0,9	10%±0,8	21%±0,9

Tab. 3

Procentuální vyjádření obsahu porostlé plochy Petriho misek u kmenů A 566 (*A. gallica*), A 535 (*A. cepistipes*), A 580 (*A. ostoyae*) při pH 6



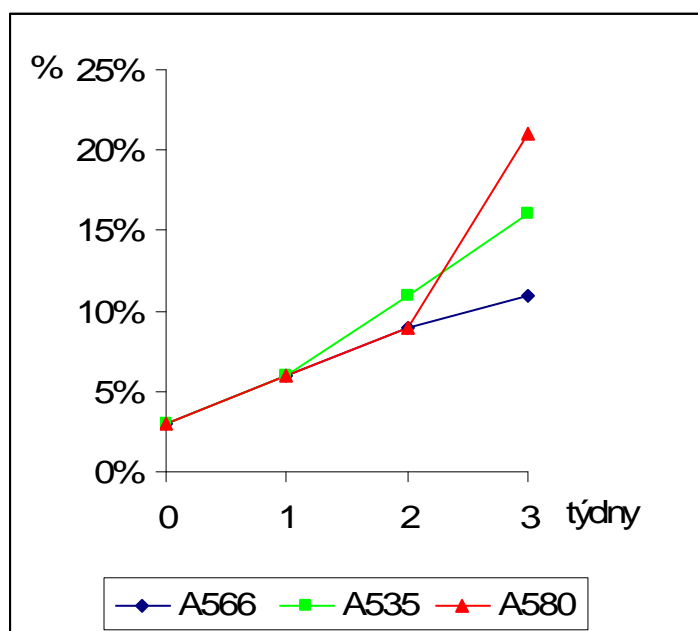
Graf 2

Grafické znázornění rychlosti růstu kmenů A 566 (*A. gallica*), A 535 (*A. cepistipes*), A 580 (*A. ostoyae*) na živné půdě při pH 6

	pH 7		
kmen/týdny	1.	2.	3.
A566	5%	7%	13%
	8%	10%	10%
	6%	9%	11%
průměr	6%±1,2	9%±1,2	11%±1,2
A535	6%	12%	17%
	6%	10%	14%
	5%	10%	16%
průměr	6%±0,4	11%±0,9	16%±1,2
A580	6%	9%	23%
	6%	9%	19%
	5%	8%	20%
průměr	6%±0,4	9%±0,4	21%±1,6

Tab. 4

Procentuální vyjádření obsahu porostlé plochy Petriho misek u kmenů A 566 (*A. gallica*), A 535 (*A. cepistipes*), A 580 (*A. ostoyae*) při pH 7



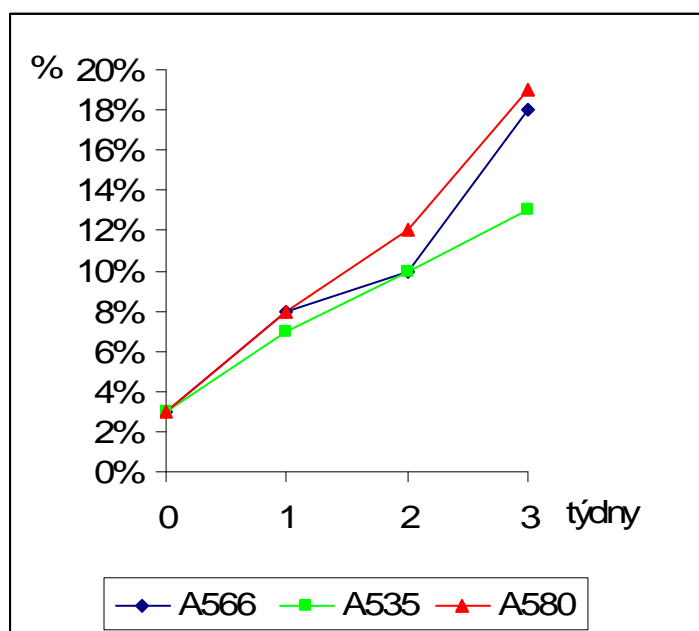
Graf 3

Grafické znázornění rychlosti růstu kmenů A 566 (*A. gallica*), A 535 (*A. cepistipes*), A 580 (*A. ostoyae*) na živné půdě při pH 7

	pH 8		
kmen/týdny	1.	2.	3.
A566	7%	9%	17%
	9%	11%	19%
	7%	11%	17%
průměr	8%±0,9	10%±0,9	18%±0,9
A535	8%	11%	13%
	7%	10%	12%
	5%	10%	14%
průměr	7%±1,2	10%±0,4	13%±0,8
A580	10%	15%	27%
	7%	9%	16%
	7%	11%	15%
průměr	8%±1,4	12%±2,4	19%±0,5

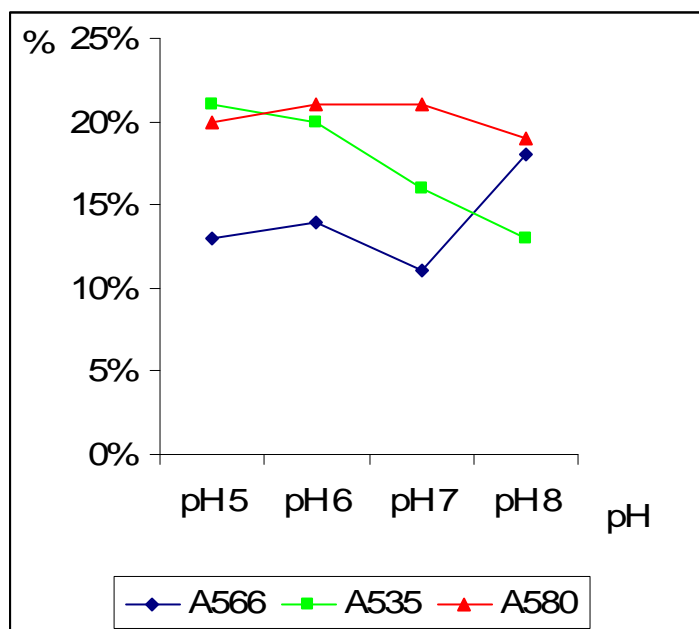
Tab. 5

Procentuální vyjádření obsahu porostlé plochy Petriho misek u kmenů A 566 (*A. gallica*), A 535 (*A. cepistipes*), A 580 (*A. ostoyae*) při pH 8



Graf 4

Grafické znázornění rychlosti růstu kmenů A 566 (*A. gallica*), A 535 (*A. cepistipes*), A 580 (*A. ostoyae*) na živné půdě při pH 8



Graf 5

Množství porostlé plochy u kmenů A 566 (*A. gallica*), A 535 (*A. cepistipes*), A 580 (*A. ostoyae*) po třech týdnech růstu v závislosti na pH

4.2. Kultivace za různých koncentrací glukózy

Tabulky 6 až 11 znázorňují postupný růst jednotlivých kmenů v období tří týdnů za různých koncentrací glukózy v mediu.

konc. glukózy	0 g/l		
týdny	1.	2.	3.
A 550	5%	10%	11%
	5%	6%	7%
	5%	7%	10%
průměr	5%±0	8%±1,6	9%±1,6
A513	8%	11%	12%
	4%	5%	7%
	5%	6%	7%
průměr	6%±1,6	7%±2,6	9%±2,3
A565	4%	6%	7%
	5%	7%	9%
	5%	6%	8%
průměr	5%±0,4	6%±0,4	8%±0,8

Tab. 6

konc. glukózy	10 g/L		
týdny	1.	2.	3.
A 550	4%	8%	11%
	4%	9%	11%
	5%	10%	12%
průměr	4%±0,5	9%±0,8	11%±0,5
A513	12%	17%	20%
	17%	20%	22%
	15%	16%	19%
průměr	15%±2	18%±1,7	20%±1,2
A565	6%	9%	16%
	7%	10%	15%
	8%	10%	15%
průměr	7%±0,8	10%±0,4	15%±0,4

Tab. 7

konc. glukózy	20 g/l		
týdny	1.	2.	3.
A 550	4%	10%	13%
	4%	8%	11%
	4%	9%	13%
průměr	4%±0	9%±0,8	12%±0,9
A513	11%	15%	19%
	18%	25%	30%
	13%	16%	18%
průměr	14%±2,9	19%±0,5	22%±0,5
A565	9%	20%	25%
	8%	13%	20%
	8%	15%	20%
průměr	8%±0,4	16%±2,9	22%±2,3

Tab. 8

konc. glukózy	30 g/l		
týdny	1.	2.	3.
A 550	5%	10%	14%
	4%	9%	14%
	5%	9%	13%
průměr	5%±0,5	9%±0,6	14%±0,5
A513	16%	21%	28%
	14%	22%	27%
	13%	20%	25%
průměr	14%±1,2	21%±0,8	27%±1,2
A565	7%	17%	21%
	4%	7%	10%
	8%	15%	20%
průměr	6%±1,7	13%±0,5	17%±0,5

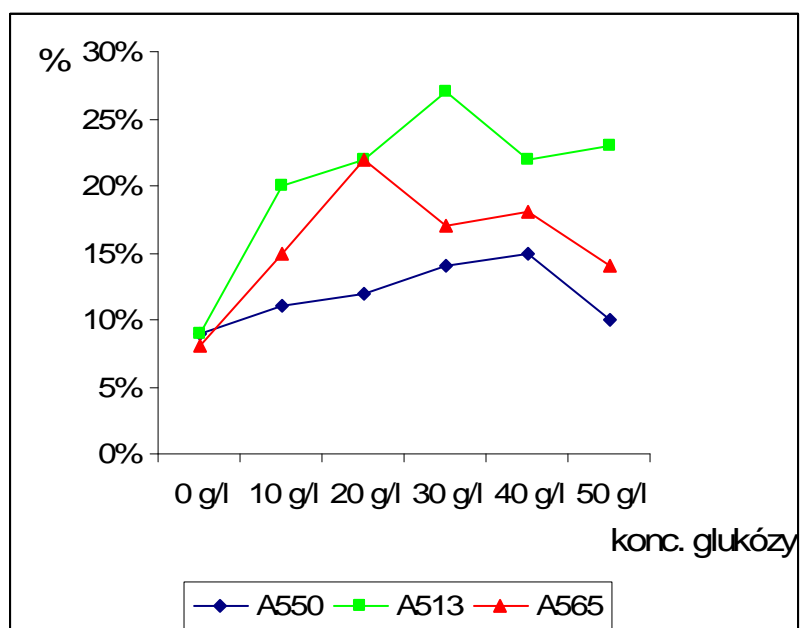
Tab. 9

konc. glukózy	40 g/l		
týdny	1.	2.	3.
A 550	5%	9%	15%
	6%	12%	16%
	5%	10%	15%
průměr	5%±0,5	10%±1,2	15%±0,5
A513	17%	19%	22%
	12%	19%	24%
	13%	16%	21%
průměr	14%±2,2	18%±1,4	22%±1,2
A565	4%	13%	17%
	12%	16%	19%
	8%	14%	17%
průměr	8%±3,3	14%±1,2	18%±0,9

Tab. 10

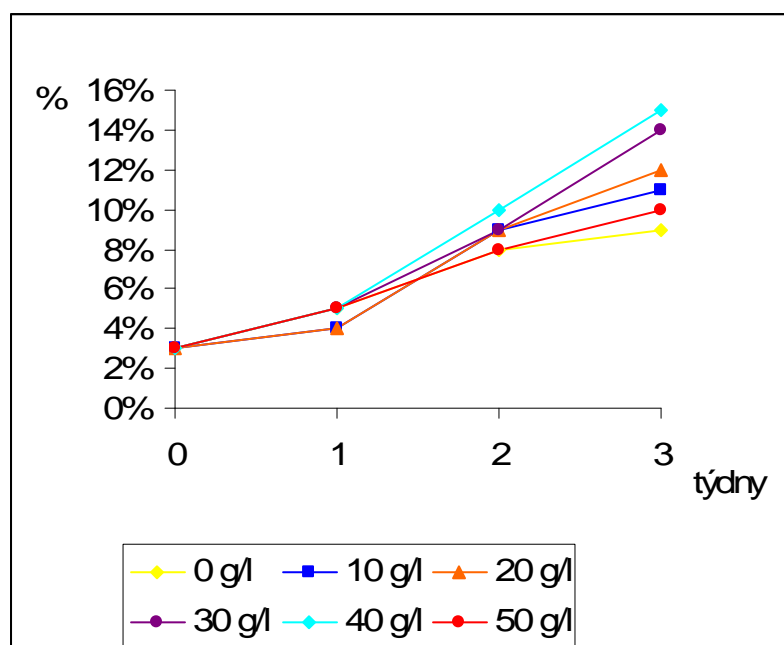
konc. glukózy	50 g/l		
týdny	1.	2.	3.
A 550	5%	8%	11%
	4%	7%	10%
	5%	8%	10%
průměr	5%±0,5	8%±0,5	10%±0,5
A513	9%	18%	21%
	12%	25%	27%
	11%	19%	21%
průměr	11%±1,2	21%±3,0	23%±2,3
A565	5%	7%	12%
	6%	13%	16%
	7%	9%	13%
průměr	6%±0,8	10%±2,5	14%±1,7

Tab. 11



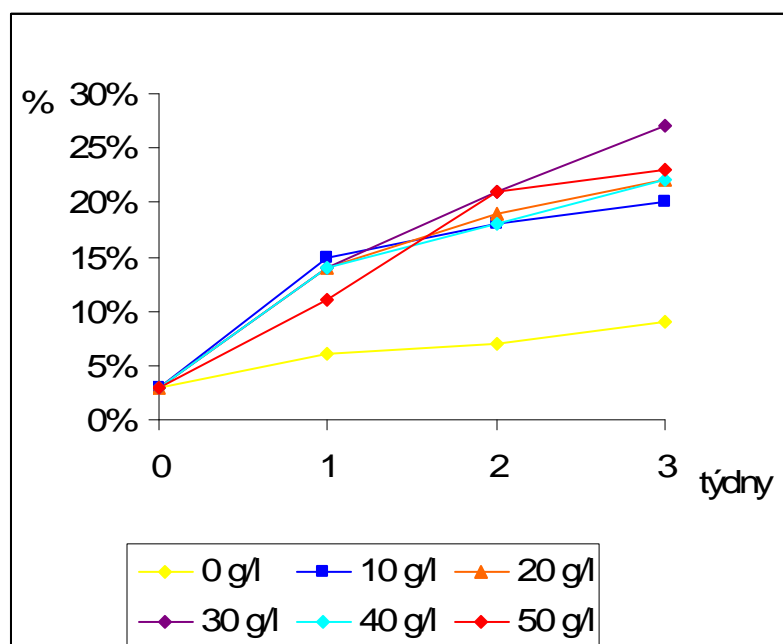
Graf 6

Množství porostlé plochy u kmenů A 550 (*A. gallica*), A 513 (*A. cepistipes*), A 565 (*A. ostoyae*) po třech týdnech růstu v závislosti na koncentraci glukózy v mediu



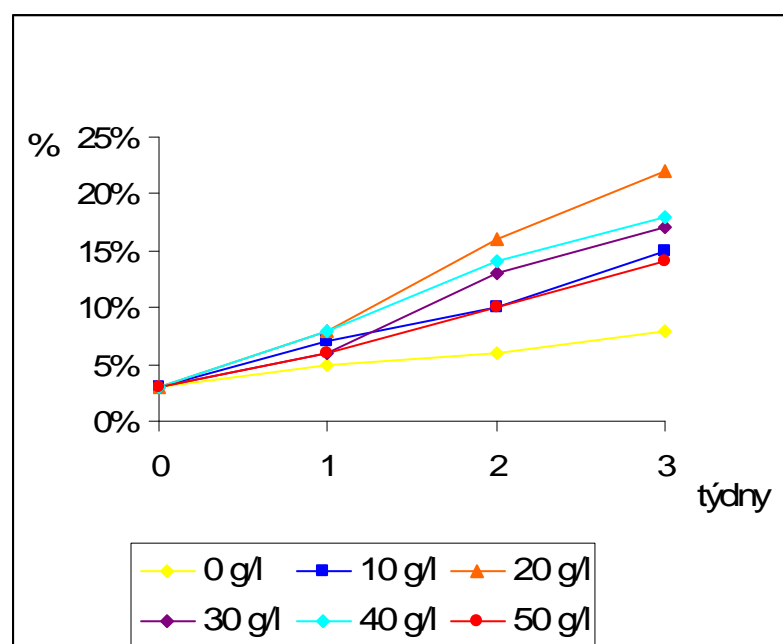
Graf 7

Rychlost růstu kmenu A 550 (*A. gallica*) v závislosti na koncentraci glukózy mediu



Graf 8

Rychlost růstu kmenu A 513 (*A. cepistipes*) v závislosti na koncentraci glukózy mediu


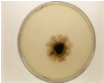


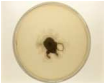

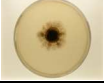
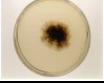
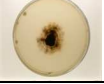







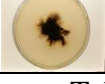

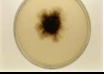
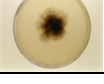


Graf 9

Rychlost růstu kmenu A565 (*A. ostoyae*) v závislosti na koncentraci glukózy mediu

4.3. Kultivace na půdách s různou koncentrací vybraných alkoholů

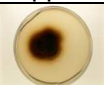
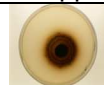



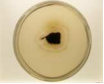
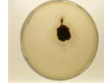
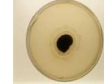
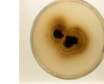


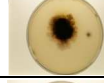








A566	0 ppm	100 ppm	500 ppm	1000 ppm	2000 ppm
metanol	18%	19%	22%	24%	23%
etanol	22%	21%	23%	22%	24%
isopropanol	20%	19%	21%	20%	20%
isobutanol	22%	20%	20%	21%	22%

A566	0 ppm	100 ppm	500 ppm	1000 ppm	2000 ppm
metanol					
etanol					
isopropanol					
isobutanol					

Tab. 12

Množství porostlé plochy u kmene A 566 (*A. gallica*) po třech týdnech růstu v závislosti na různé koncentraci vybraných alkoholů (vyjádřeno procentuálně a graficky)

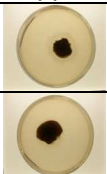
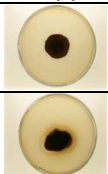
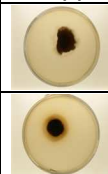


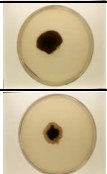
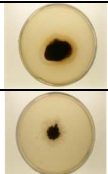
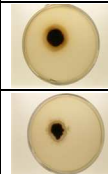


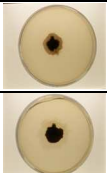
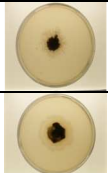
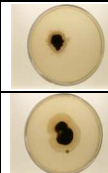



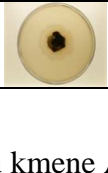
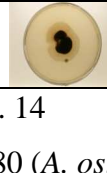
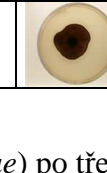

A535	0 ppm	100 ppm	500 ppm	1000 ppm	2000 ppm
metanol	28%	28%	30%	25%	25%
etanol	28%	28%	26%	29%	26%
isopropanol	25%	25%	25%	30%	25%
isobutanol	31%	30%	30%	37%	44%

A535	0 ppm	100 ppm	500 ppm	1000 ppm	2000 ppm
metanol					
etanol					
isopropanol					
isobutanol					

Tab. 13


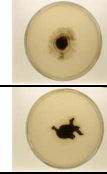
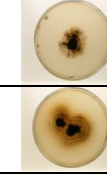




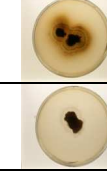



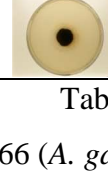



Množství porostlé plochy u kmene A 535 (*A. cepistipes*) po třech týdnech růstu v závislosti na různé koncentraci vybraných alkoholů (vyjádřeno procentuálně a graficky)

A580	0 ppm	100 ppm	500 ppm	1000 ppm	2000 ppm
metanol	24%	29%	22%	23%	25%
etanol	21%	27%	21%	19%	24%
isopropanol	23%	23%	22%	23%	27%
isobutanol	26%	28%	29%	26%	32%

A580	0 ppm	100 ppm	500 ppm	1000 ppm	2000 ppm
metanol					
etanol					
isopropanol					
isobutanol					

Tab. 14

Množství porostlé plochy u kmene A 580 (*A. ostoyae*) po třech týdnech růstu v závislosti na různé koncentraci vybraných alkoholů (vyjádřeno procentuálně a graficky)

	ME medium	HN-HC medium metanol	HN-HC medium etanol	HN-HC medium isopropanol	HN-HC medium isobutanol
konc. alkoholů	0 ppm	1000 ppm	1000 ppm	1000 ppm	1000 ppm
A566					
A535					
A580					

Tab. 15

Srovnání kultivace kmenů A 566 (*A. gallica*), A 535 (*A. cepistipes*), A 580 (*A. ostoyae*) na ME mediu v porovnání s HN-HC mediem s různými alkoholy o koncentraci 1000 ppm

4.4. Kultivace pro analýzu nukleových kyselin



Obr. 5

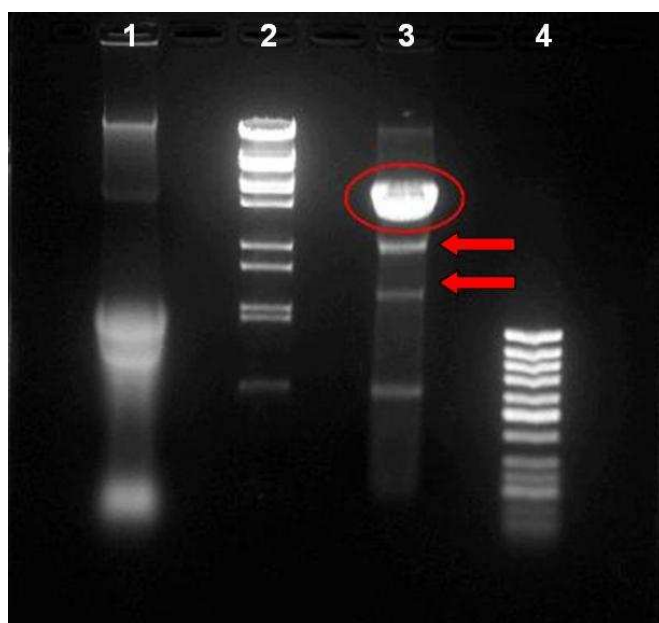
Kultivace kmenů na tekutých GC mediích pro následnou izolaci RNA

Kultivace probíhala po dobu tří týdnů. Narostlá biomasa byla propláchnuta vodou, zamražená a lyofilizována. Z takto upravených vzorků byla izolována RNA. Tímto způsobem se podařilo řádově vypěstovat 20 až 80 g biomasy pro každý kmen.

4.5. Izolace RNA

Ověření metodiky izolace pomocí práškové celulózy CF-11

Izolace RNA z *Endomyces magnusii* (kmen DMPU4-1-1, ze sbírky katedry genetiky a mikrobiologie Karlovy Univerzity v Praze)



Obr. 6

0,9 % agarózový gel v 1 × TAE pufru, barveno syber gold

1 – vzorek *E. magnusii* eluovaný z kolonky pufrem STE-15 (obsahující 15% etanolu v/v), 20μl

2 - marker λ DNA/*Eco*91I, 4 μl

3 – vzorek *E. magnusii* uvolněný z kolonky čistým STE pufrem, 20 μl
kroužek označuje majoritní proužek RNA, šipkami jsou označeny slabší proužky RNA

4 – marker 1000bp/DNA Ladder plus, 4 μl

Izolace RNA z *Agaricus bisporus*



Obr. 7

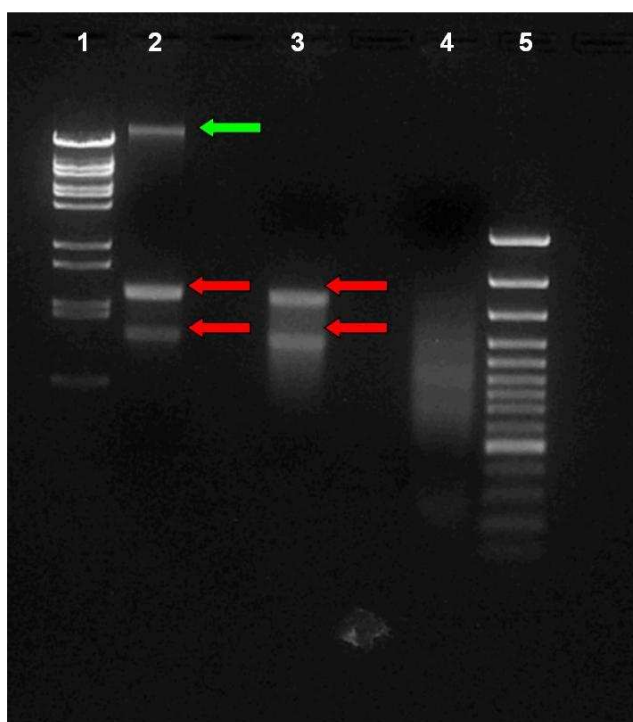
0,9 % agarózový gel v 1 × TAE pufru, barveno syber gold

1 - marker λ DNA/*Eco*91I, 4 μl

2 – vzorek *Agaricus bisporus*, 20μl, původní biomasa cca. 60g, předpokládaná velikost RNA 2,4 kb

3 - marker 1000bp/DNA Ladder plus, 4 μl

Izolace RNA z kmene A518



Obr. 8

0,9 % agarózový gel v $1 \times$ TAE pufru, barveno syber gold

1 - marker λ DNA/*Eco91I*, 4 μ l

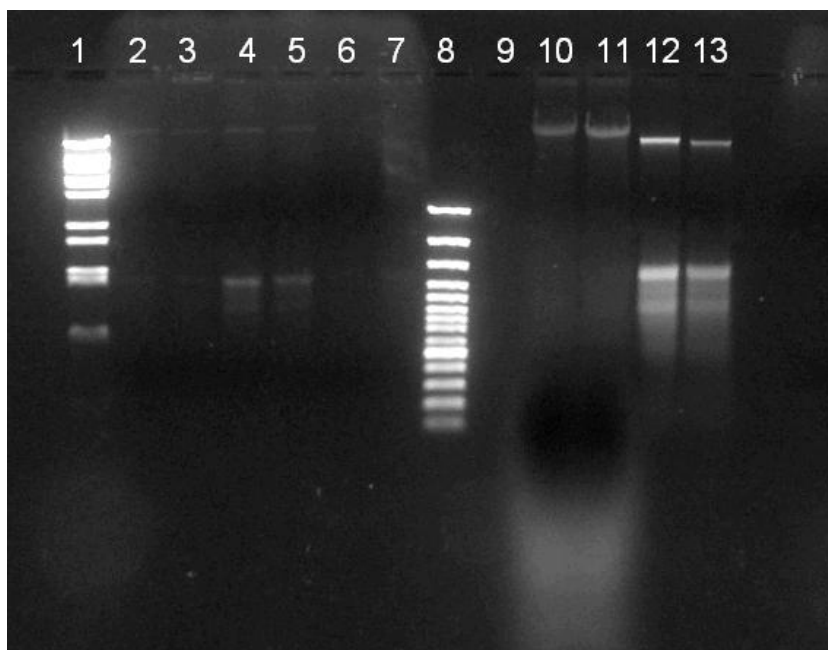
2 – vzorek A518, 20 μ l, zelná šipka označuje zbytky chromosomální DNA, červené šipky zobrazují ribozomální RNA

3 - vzorek A518, 20 μ l, po opůsobení DNázou

4 – vzorek A518, 20 μ l, po opůsobení RNázou

5 - marker 1000bp/DNA Ladder plus, 4 μ l

Ukázka izolací nukleových kyselin z vybraných kmenů rodu *Armillaria*



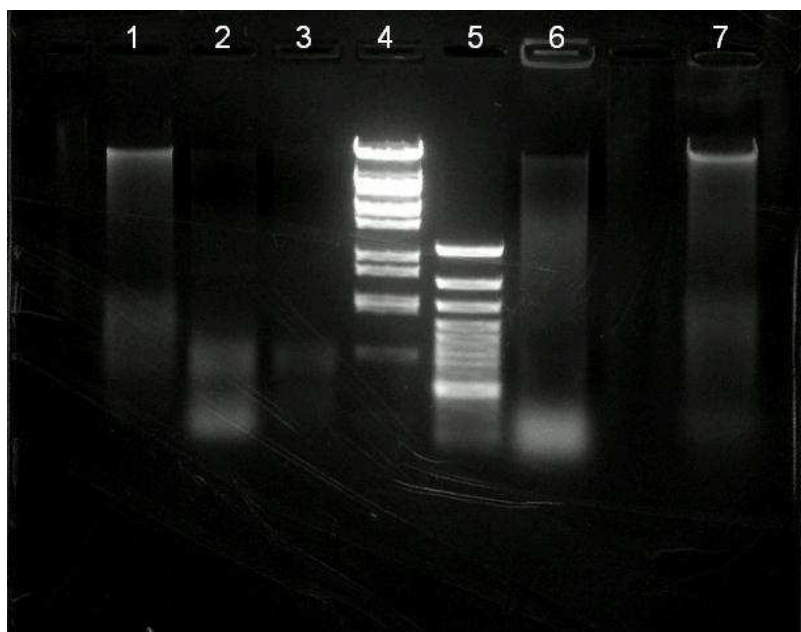
Obr. 9

0,9 % agarózový gel v 1 × TAE pufru, barveno syber gold

číslo vzorku	kmen
2	A509
3	A556
4	A565
5	A520
6	A560
7	A524
9	A566
10	A580
11	A577
12	A584
13	A540

1 - marker λ DNA/*Eco*91I, 4 μ l

8 - marker 1000bp/DNA Ladder plus, 4 μ l



Obr. 10

0,9 % agarózový gel v $1 \times$ TAE pufru, barveno syber gold

Číslo vzorku	kmen
1	A7
2	A11
3	A4
6	A1
7	A8

4 - marker λ DNA/*Eco91I*, 4 μ l

5 - marker 1000bp/DNA Ladder plus, 4 μ l

4.6. Fruktifikace



Obr. 11

Kmeny A535, A580, A566 po třítýdenní kultivaci s viditelnými rhizomorfami

Jak je zřejmé z uvedených fotografií, po třítýdenní kultivaci uvedených kmenů došlo k dobře viditelné tvorbě rhizomorf (hnědá vlákna rozprostřená podél stěn kultivační nádoby). K tvorbě primordií docházelo ojediněle a jejich velikost nepřesahovala 0,5 cm. K tvorbě plodnic v průběhu experimentu (1 měsíc) nedocházelo.

5. Diskuze

Václavky vytvářejí v přírodě velmi spleť a rozsáhlé sítě rhizomorf, které slouží k jejich šíření v půdě. Jsou tak vystaveny působení mnoha vnějších faktorů, které mohou ovlivňovat jejich růst. Jedná se o faktory abiotické, jako je pH půdy (Marçais & Wargo 2000) vlhkost, chemické složení, zrnitost, tak o faktory biotické (různé jiné půdní mikroorganismy, které mohou s václavkami interagovat). Stejně tak mohou tyto faktory ovlivňovat hostitelské rostliny, které václavky napadají. Nízká hodnota pH představuje dlouhodobý stresový faktor pro některé druhy rostlin, které pak mohou být náchylnější k infekci václavkou (Godbold & Hutterman 1994). Některé druhy mikroorganismů mohou stimulovat určité kmeny

václavek k tvorbě rhizomorf, např. některé druhy rodu *Penicillium* (Kwašna *et al.* 2004).

Za laboratorních podmínek je vnějškový vzhled kolonií jednotlivých kmenů značně variabilní a měnící se v čase. Jednotlivé kmeny mohou do media vylučovat tmavý pigment, mohou vytvářet, síť rhizomorf, nebo naopak kompaktní kolonie s hladkým okrajem. Tyto vlastnosti nejsou pro jednotlivé kmeny stále a mění se v závislosti na kultivačních podmínkách. Problém kultivace kmenů václavek spočívá v relativně pomalém růstu ve srovnání s ostatními dřevokaznými houbami. S dlouhodobou kultivací jsou spojené problémy s plísnovými a bakteriálními kontaminacemi. Tento problém přináší obtíže při studiu tohoto rodu z mikrobiologického hlediska. Z tohoto důvodu jsem se zaměřil v této práci na určité faktory, které by mohly pozitivně ovlivnit rychlost kultivací jednotlivých kmenů. Cílem práce byla i snaha zjistit, jestli existují určité rozdíly v nárocích na laboratorní kultivaci mezi jednotlivými druhy. Zjišťoval jsem také, zda by určité faktory nemohly mít trvalý vliv na morfologii kolonií. Šlo mi především o to cíleně vyvolat u jednotlivých kmenů tvorbu rhizomorf. Pokoušel jsem se také simulovat takové laboratorní podmínky, které by byly příznivé pro tvorbu plodnic. Tvorba plodnic václavek je sezónní záležitost s poměrně krátkou dobu trvání. Je ovlivněna vícero faktory, mezi které patří teplotní změny na konci léta (chladné noci), změna fotoperiody, změna relativní vlhkosti. Obecně je fruktifikace plodnic za laboratorních podmínek velmi obtížná. Závisí na mnoha faktorech, které není možné simulovat. Provázanost těchto faktorů je navíc značná a komplikovaná. Z ekologického hlediska se daří fruktifikace hlavně u dřevokazných a saprotofních hub, které se ve velkém pěstují jako potraviny např. hlíva, žampion. Schopnost vyvolat fruktifikaci u václavek je zajímavá jak z hlediska potravinářského (václavka je jedlá houba), tak z hlediska výzkumného (izolace různých látek). Množství biomasy vzniklé při fruktifikaci je totiž mnohem větší, než množství biomasy vypěstované kultivací na tekutých médiích. Použil jsem metodu pěstování václavek na substrátu z pilin (Togashi 1996). Do poloviny Erlenmayerových baněk jsem přidal strouhanou mrkev, která by měla indukovat tvorbu rhizomorf (Togashi & Takizawa 1994). Rhizomorfy se ale tvořily se stejnou intenzitou i u kontrolních vzorků bez mrkve. Fruktifikaci se nám nepodařilo za předepsaných podmínek dosáhnout, ale na substrátu se vytvořila aspoň primordia. Největší množství kmenů jsem ale podrobil izolaci RNA s cílem nálezt dsRNA elementy. Takové elementy

jsou příznakem virové infekce u hub. Většina dosud objevených virů u vyšších basidiomycetů, byla objevena u druhů, které se v zemědělských výrobcích pěstují ve velkém. Téměř nic není známo o přirozeném výskytu houbových virů. Václavka se jeví jako model k tomuto výzkumu. Jednotlivé klony mohou růst na obrovských plochách a mohou dosahovat vysokého stáří (Smith *et al.* 1992). Takto rozsáhlé organismy interagují na mnoha úrovních s velkým množstvím jiných organismů. Tyto interakce by mohli vést i k výměně genetických elementů. Některé houbové viry jsou pravděpodobně příbuzné s rostlinnými RNA viry (Ghabrial 1998). Václavky se svojí ekologií podobají druhu *Heterobasidion annosum*. U tohoto druhu byly dsRNA elementy objeveny (Ihrmark *et al.* 2001). Václavka je také v lesích poměrně běžný typ houby a tak není na podzim problém se sběrem vzorků.

Při experimentech, kde jsem sledoval změny rychlosti růstu kolonií, nebo morfologické změny jsem používal HN-HC medium. Je to přesně chemicky definované medium, u kterého lze snadno změnit jeden či více parametrů (koncentrace glukózy, hodnota pH) a sledovat tak změny v rychlosti růstu. Václavky na tomto mediu rostou o poznání pomaleji než na komplexních mediích GC a ME. Naproti tomu na GC a ME mediích navíc jednotlivé kmeny častokrát spontánně vytvářejí rhizomorfy. Na HN-HC mediu většina pěstovaných kmenů vytvářela hladké kolonie, a toto medium je proto vhodné pro studium faktorů stimulujících růst rhizomorf.

U třech vybraných kmenů A 566 (*A. gallica*), A 535 (*A. cepistipes*), A 580 (*A. ostoyae*) jsem testoval jejich schopnost růstu a vznik případných morfologických změn za různých hodnot pH (Boddy & Jones 2006). Sledoval jsem jejich růst na pevných agarových mediích, u kterých jsem upravil pH na hodnoty 5, 6, 7, 8. Pomocí počítačové analýzy fotografií jsem stanovil procentuální poměr porostlých ploch na Petriho miskách. Výsledky viz (graf 5) Z těchto výsledků vyplývá, že jednotlivé kmeny rostou lépe za nižších hodnot pH, patrně je to hlavně u kmene A535. V přírodních podmínkách osidlují václavky rozmanité půdní prostředí, jsou rozšířené kosmopolitně a nejsou příliš citlivé na extrémnější hodnoty pH.

Jelikož václavky rostou za laboratorních podmínek pomaleji než ostatní dřevokazné houby, zkoušel jsem měnit v mediu koncentraci glukózy s cílem nalézt optimum pro kultivace. Testoval jsem tři kmeny A 550 (*A. gallica*), A 513 (*A. cepistipes*), A 565 (*A. ostoyae*). Zkoušel jsem koncentrace 0 g/l, 10 g/l, 20 g/l, 30 g/l, 40 g/l, 50 g/l. Růst jednotlivých kmenů byl opět vyjádřen v procentuálním

poměru porostlé plochy ke zbytku Petriho misky. Výsledky zobrazené v grafu 6 ukazují, že optimum pro kultivace se nachází zhruba mezi 20 až 30 g/l.

Tvorba rhizomorf, za laboratorních podmínek, je u jednotlivých kmenů velmi variabilní. Jednotlivé kmeny se od sebe v míře tvorby rhizomorf značně liší a ovlivňuje jí i způsob kultivace. V přírodě závisí tvorba rhizomorf na různých faktorech. Indukce tvorby rhizomorf se za laboratorních podmínek zkoušela pomocí různých látek. Já jsem se zaměřil na alkoholy. Konkrétně na metanol, etanol, isopropanol, isobutanol. Nízké koncentrace alkoholů mají vliv na intenzitu tvorby rhizomorf (Weinhold 1963). Testoval jsem kmeny A 566 (*A. gallica*), A 535 (*A. cepistipes*), A 580 (*A. ostoyae*). Žádný z těchto kmenů netvoří na HN-HC mediu spontánně rhizomorfy. Připravil jsem roztoky těchto alkoholů a napipetoval je do Petriho misek s 20 ml HN-HC media tak, aby výsledné koncentrace odpovídaly hodnotám 100 ppm, 500 ppm, 1000, ppm, 2000 ppm. Kultivace probíhala po dobu tří týdnů. V intervalech jednoho týdne byly misky fotografovány a pro zjištění obsahu porostlé plochy Petriho misky následně počítačově analyzovány. V rozporu s dřívějšími zjištěními (Weinhold 1963) se mi touto metodou nepodařilo u zkoumaných kmenů vyvolat tvorbu rhizomorf. Mezi jednotlivými koncentracemi alkoholů nebyly ani patrné rozdíly v rychlosti růstu. Naopak rhizomorfy se ochotně tvořily na komplexním ME mediu bez přidání jakéhokoli alkoholu viz. Tab. 15. Rozdílné výsledky mohou být způsobeny velkou variabilitou jednotlivých václavkových kmenů v jejich schopnosti rhizomorfy vytvářet. Svou roli může hrát i složení živného media. Jednotlivé kmeny mají tendence tvořit rhizomorfy spíše v mediích, které jsou bohaté na organické látky jako je třeba malt extrakt (u HN-HC media je jedinou organickou látkou glukóza a vinnan amonný). Další možností v rozdílnosti výsledků je, že jsem použil pevné agarové medium, v původním experimentu bylo použito medium tekuté (Weinhold 1963). Alkoholy mohly díky svým OH skupinám interagovat s polysacharidy, které jsou součástí agaru.

Pro kultivaci jednotlivých kmenů pro následnou analýzu RNA profilů jsem použil dvě komplexní media (GC, ME). Při kultivaci na obou mediích jsem získal srovnatelné množství biomasy.

Metodu pro izolaci RNA jsem zvolil takzvanou izolaci pomocí práškové celulózy CF-11 (Whatman). Tato metoda se široce používá pro izolaci RNA z rostlinných a houbových vzorků (Morris and Dodds 1979, Ihrmark *et al.* 2001, Grogan *et al.* 2003). Fukčnost této metody sem si ověřil na izolaci dsRNA z pozitivního kmene

E. magnusii, který dsRNA obsahoval obr 6. Pro další ověření metody jsem izoloval RNA ze vzorku *Agaricus bisporus* obr.7. Z tohoto vzorku se podařilo získat RNA o velikosti zhruba 2,4 kb. U žampionů se předpokládá, že mohou celkem běžně obsahovat určité dsRNA elementy (Grogan *et al.* 2003). Z žádného testovaného kmene se mi nepodařilo vyizolovat dsRNA. Důvodů může být několik. Promořenost dsRNA elementy v přírodních populacích hub je poměrně nízká (Ihrmark *et al.* 2001). Další možností je, že distribuce RNA elementů v populacích hub je geograficky podmíněná. K izolaci byly použity pouze kmeny nasbírané na území ČR. Jednotlivé klony václavek mohou růst na velkých plochách (Smith *et al.* 1992) a z toho důvodu může několik zdánlivě různých kmenů představovat tentýž organismus. Další možností je, že úspěšnost izolace pomocí metody s CF-11 si vyžaduje značné množství biomasy na analýzu, desítky gramů (Grogan *et al.* 2003), což vyžaduje značné nároky na kultivaci. Obecně je pak problematika mykovirů u vyšších hub řešena převážně u druhů, které jsou lidmi masivně pěstovány (žampiony, hlíva, shii-take). Oblast poznání výskytu RNA elementů u přírodních populací basidiomycetů tak zůstává neznámá.

6. Souhrn

Vybrané kmeny byly podrobeny sérii pokusů ve snaze zjistit určité fyziologické rozdíly mezi jednotlivými druhy (*A. gallica*, *A. cepistipes*, *A. ostoyae*). Všechny kmeny shodně reagovaly na změny pH prostředí a koncentrace glukózy. Jejich reakce na různě nastavené hodnoty vnějšího prostředí se sice lišily, ale ne dostatečně, aby to vedlo k závěru o rozdílných nárocích na prostředí mezi těmito druhy. U žádného kmene se nepodařilo stimulovat tvorbu rhizomorf v důsledku přítomnosti alkoholů v mediu. Tvorba rhizomorf byla závislá spíše na použitém mediu, než na přítomnosti alkoholů. Rhizomorfy se tvořily na komplexních mediích na HN-HC mediu se netvořily nikdy. U jednotlivých kmenů byla izolována RNA pomocí metody s práškovou celulózu CF-11 (Whatman) za účelem snahy objevení dsRNA elementů. Všechny zkoumané vzorky byly na přítomnost dsRNA negativní.

7. Seznam citované literatury

- Barroso G., Labarere J., 1990, Evidence for viral and naked double-stranded RNAs in the basidiomycete *Agrocybe aegerita*, Curr. Genet., 18, 231-237
- Barroso G., Labarere J., 2000, Distribution and transmission of *Agrocybe aegerita* dsRNAs, Science and Cultivation of Edible Fungi, 1, 271-280
- Bharathan N., Saso H., Gudipati L., Bharathan S., Whited K., Antony K., 2005, Double-stranded RNA distribution and analysis among isolates of *Rhizoctonia solani* AG-2 to-13, Plant Pathology, 54(2), 196
- Boddy L., Jones H. T., 2006, Mycelial responses in heterogenous environments: parallels with macroorganisms, Fungi in the environment, str. 114 – 116, Cambridge university press
- Brown A. K., 2002, Historical oak woodland detected through *Armillaria mellea* damage in fruit orchards, USAD Forest Service Gen. Tech. Resp., PSW-GTR-184
- Coggins J., R., Abell C., Evans L., B., Frederickson M., Robinson D., A., Roszak A., W., Laphorn A., P., 2003, Experiences with the shikimate-pathway enzymes as target for rational drug design, Biochemical Society Transaction, 31(3)
- Cox, K.K., Scherm, H., Beckman, T.G. 2004, *Armillaria* root and crown rot, Southeastern Peach Growers Handbook
- Downer J. , 2004, *Armillaria* root rot, Landscape Notes, vol. 17, no. 5 & 6
- Fogarty, R.V.; Tobin, J.M., 1996, Fungal melanins and their interactions with metals, Enzym. Microb. Technol., 19: 311–317.
- Gaze R., H., Calvo-Bado L., Challen M., P., Adie B., Romaine C., P., 2000, A new virus disease of *Agaricus bisporus*?, Mushroom Science, 15, 701-705
- Ghabrial 1998, Origin adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses, Virus genes, 16:1, 119-131 1998

- Godbold D., L., Hüttermann A., 1994, Effects of acid rain on Forest processes, str.169
- Grogan H., M., Adie B., A., T., Gaze R., H., Challen M., P., Mills P., R., 2003, Double-stranded RNA elements associated with the MVX disease of *Agaricus bisporus*, Mycol. Res., 107(2), 147-154
- Harmsen M., C., Tolner B., Kram A., Go S., J., De Haan A., Wessels J., G., H., 1991, Sequences of three dsRNAs associated with *La France disease* of the cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*), Curr. Genet., 20, 137-144
- Hyun Jae Yu, Dongbin Lim, Hyun-Sook Lee, 2003, Characterization of a novel single-stranded RNA mycovirus in *Pleurotus ostreatus*, Virology, 314, 9-15
- Hyun Jae Yu, Lee Jung Sun, Lee Nam Joo, Ha Si Jung, Kim So Yeon, Gang Fu Joo, Bae Dong Won, Chang Moo Ung, Lee Hyun Sook, 2004, Identification of three Isometric Viruses from *Pleurotus ostreatus*, Journal of Huazhong Agricultural University, 23(1), 150-156
- Ihrmark K., Johannesson H., Stenström E., Stenlid J., 2002, Transmission of double-stranded RNA in *Heterobasidion annosum*, Fungal Genetics and Biology, 36(2), 147-154
- Ihrmark K., Stenström E., Stenlid J., 2004, Double-stranded RNA transmission through basidiospores of *Heterobasidion annosum*, Mycol. Res., 108(2), 149-153
- Ihrmark K., Zheng J., Stenstrom E., Stenlid J., 2001, Presence of double-stranded RNA in *Heterobasidion annosum*, For. Path., 31, 387-394
- Irvine G., Moran J., 1999, *La France disease* of cultivated mushrooms, Agriculture notes 0518, State of Victoria, Department of Primary Industries
- Jankovský L., Scháněl L., 1999, Effect of temperature on the growth and morphological variability of *Armillaria mycelium in vitro*, Houby a les – sborník referátů, str.133
- Jian J., Lakshman D., K., Tavantzis S., M., 1998, A Virulence-Associated, 6,4-kb, Double-stranded RNA from *Rhizoctonia solani* Is Phylogenetically Related to Plant Bromoviruses and Electron Transport Enzymes, MPMI, 11(7), 601-609

Kwaśna H., Łakomy P., Mallett K., 2004, Reaction of *Armillaria ostoyae* to forest soil microfungi, Forest pathology, vol 34, Issue 3, pages 147 – 162

Lakshman D., K., Jian J., H., Tavantzis S. M., 1998, A double-stranded RNA element from a hypovirulent strain of *Rhizoctonia solani* occurs in DNA form and is genetically related to the pentafunctional AROM protein of the shikimate pathway, Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 95(11), 6425-6429

Lakshman D., K., Tavantzis S., M., 1994, Spontaneous appearance of genetically distinct double-stranded RNA elements in *Rhizoctonia solani*, Phytopathology, 84(6), 633-639

Lemke P., A., Nash C., H., 1974, Fungal Viruses, Bacteriological Reviews, 38, 29-56

Lamour Angelique, Termorshuizen Aad J., Volker Dine., Jeger Michael J, 2007, Network formation by rhizomorphs of *Armillaria lutea* in natural soil: their description and ecological significance, FEMS Microbiol, 62,222-232)

Lim W., S., Jeong J., H., Jeong R., D., Yoo Y., B., Yie S., W., Kim, K., H., 2005, Complete nucleotide sequence and genome organization of a dsRNA partitivirus infecting *Pleurotus ostreatus*, Virus Research, 108(1-2), 111-119

Magae Y., Hayashi N., 1999, Double-stranded RNA and virus-like particles in the edible basidiomycete *Flammulina velutipes*, FEMS Microbiology Letters, 180, 331-335

Marçais B, Wargo P. M., 2000, Impact of liming on the abundance and vigor of *Armillaria* rhizomorphs in Allegheny hardwoods stands, Can. J. For. Res., 30(12): 1847–1857

Mašek T., Vopálenský V., Suchomelová P., Pospíšek M., 2005, Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels, Analytical Biochemistry, 336, 46 - 50

Morris T., J., Dodds J., A., 1979, Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus – infected plant and fungal tissue, Phytopathology, vol. 69, No. 8, p. 854 - 858

- Morrison, B, J, 2004, Rhizomorph growth habit, saprophytic ability and virulence of 15 *Armillaria* species, For. Path., 34, 15 - 26
- Martin T., R., 1999, Honey fungus – *Armillaria*, Technical report, Bartlett tree research laboratories
- Pataky N., R., 2000, *Armillaria* root rot of trees and shrubs, Reports on plant disease
- Pospíšek M., 1998, Kvasinkové dsRNA viry I, Biologické listy, 63(2), 81-113
- Revill P., A., Davidson A., D., Wright P., J., 1994, The nucleotide sequence and genome organization of mushroom bacilliform virus: A single-stranded RNA virus of *Agaricus bisporus*, Virology, 202, 904-911
- Revill P., A., Davidson A., D., Wright P., J., 1998, Mushroom bacilliform virus RNA: The initiation of translation at the 5' end of the genome and identification of the Vpg, Virology, 249, 231-237
- Revill P., A., Davidson A., D., Wright P., J., 1999, Identification of subgenomic mRNA encoding the capsid protein of mushroom bacilliform virus, a single-stranded RNA mycovirus, Virology, 260, 273-276
- Rigling D., Günthardt-Goerg M., S., Blauenstein H., Frey B., 2006, Accumulation of heavy metals into *Armillaria* rhizomorphs from contaminated soils, For., Snow., Landsc., Res. 80, 2: 213-220
- Romaine C. P., Schlagnhauer B., 1995, PCR analysis of the viral complex associated with *La France disease* of *Agaricus bisporus*, Appl. Environ. Microbiol, 61, 2322-2325
- Smith M., L., Bruhn J., N., Anderson., J., B., 1992, The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organism, Nature, 356, 428-431
- Strauss E., E., Lakshman D., K., Tavantzis S., M., 2000, Molecular characterization of the genome of a partitivirus from basidiomycete *Rhizoctonia solani*, J. Gen. Virol., 81, 549-555

- Tavantzis S. M., Romaine C. P., Smith S. H., 1980, Purification and partial characterization of bacilliform virus from *Agaricus bisporus*: a single-stranded mycovirus, *Virology* 105, 94 – 102
- Togashi I., 1996, Effects of seeding methods on fruiting body production of the bottle cultivation of *Armillaria* species, *Journal of Hokkaido Forrest Products Research Institute*, 10 (6), p 15 – 20
- Togashi I., Takizawa N., 1994, Effect of adding carrot, *Daucus carotta* var. *sativa* to a nutrient agar medium on rhizomorph production of *Armillaria* species, *Journal of Hokkaido Forrest Products Research Institute*, 8 (5), p. 16 - 20
- Van der Lende T., R., Duitman E., Gunnewijk M., G., W., Li Yu, Wessels J., G., H., 1996, Functional analysis of dsRNAs (L1, L3, L5, and M2) associated with isometric 34-nm virions of *Agaricus bisporus* (white button mushroom), *Virology*, 217, 88-96
- Van der Lende T., R., Harmsen M., C., Go S., J., Wessels J., G., H., 1995, Double-stranded RNA mycovirus in mycelium of *Pleurotus ostreatus*, *FEMS Microbiology Letters*, 125, 51–56
- Van der Lende T., R., Harmsen M., C., Wessels J., G., H., 1994, Double-stranded RNAs and proteins associated with the 34 nm virus particles of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* , *J. Gen. Virol.*, 75, 2533-2536
- Velenovský J., 1920, *České houby*, díl I., ČSBS
- Weinhold Albert R., 1963, Rhizomorph production by *Armillaria mellea* induced by ethanol and related compounds, *Science*, vol. 142., p. 1065
- Williams R. E., Shaw C. G., Wargo P. M., Sites W. H., 1989, *Armillaria* root disease, *Forest insect & disease leaflet* 78